

**Die Bedeutung von S100A4 und dessen Interaktion mit RAGE
bei der Metastasierung des malignen Melanoms**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplombiologin Susann Christel Wolf

geboren am 25.04.1981 in Dresden

Eingereicht am 30.09.2013

Die Dissertation wurde in der Zeit von Juni 2007 bis Februar 2011
im Institut für Radiopharmazie, Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, angefertigt.

Eingereicht am: 30.09.2013

Verteidigt am: 03.03.2014

Gutachter:

Prof. Dr. Jörg Steinbach, Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung,
Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf

Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée, Professur für Allgemeine Biochemie, Technische
Universität Dresden

„Gut Ding will Weile haben“ (Volksweisheit)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Metastasierungsprozess	2
1.2	S100-Proteine	4
1.3	S100A4	4
1.3.1	Proteinstruktur	4
1.3.2	Entdeckung und Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung	7
1.3.3	Subzelluläre Lokalisation und Gewebeverteilung	8
1.3.4	Interaktionspartner und mögliche biologische Funktion	8
1.4	RAGE	10
1.4.1	Vorkommen und Lokalisation von RAGE	10
1.4.2	Struktur von RAGE	11
1.4.3	RAGE-vermittelte-Signaltransduktion	12
1.5	S100A4-RAGE-Interaktion	13
1.6	Malignes Melanom der Haut	13
1.6.1	Die Rolle von S100A4 und RAGE beim malignen Melanom	15
1.7	Zielstellung	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Geräte	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3	Chemikalien und Enzyme	21
2.1.4	Kits	23
2.1.5	Puffer, Medien und Lösungen	24
2.1.6	Plasmide	26
2.1.7	DNA-Primer	27
2.1.8	Antikörper	29
2.1.9	Zelllinien und Medien	29
2.1.10	Versuchstiere	30
2.2	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	31
2.2.1.1	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	32
2.2.1.2	Kolonie-PCR	32
2.2.1.3	Quantitative Echtzeit-RT-PCR	33
2.2.2	Enzymatische Restriktionsspaltung von DNA	34
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	35
2.2.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	35
2.2.5	Ligation von PCR-Produkten	36
2.2.6	Klonierung des humanen S100A4-Gens in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-6P-1	36
2.2.7	Klonierung des humanen und murinen S100A4-Gens in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1	37
2.2.8	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	39
2.2.9	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Bakterien	39
2.2.10	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	39
2.2.11	RNA-Isolierung aus Zellen	40
2.2.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40

2.2.13	DNase-Behandlung der isolierten RNA	40
2.3	Proteinbiochemische Methoden	41
2.3.1	Bakterielle Synthese des rekombinanten GST-S100A4 Fusionsproteins	41
2.3.2	Gewinnung des rekombinanten S100A4-Proteins aus Bakterien und dessen Reinigung mittels GST-Affinitätschromatographie	41
2.3.3	Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie	42
2.3.4	Gewinnung und Reinigung von rekombinantem sRAGE	43
2.3.5	Proteinextraktion	43
2.3.6	Extraktion von Zellkernproteinen	44
2.3.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	45
2.3.8	Western-Blot und Proteinnachweis	46
2.4	Biophysikalische Methoden	47
2.4.1	Massenspektrometrie	47
2.4.2	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie	47
2.5	Radiochemische und Radiopharmakologische Methoden	48
2.5.1	Synthese von <i>N</i> -Succinimidyl-4-[¹⁸ F]fluorbenzoat	48
2.5.2	Radiomarkierung von S100A4	48
2.5.3	Radio-SDS-PAGE von ¹⁸ F-S100A4	49
2.5.4	sRAGE-Bindungsassay	49
2.5.5	Zellassoziationsversuche mit ¹⁸ F-S100A4	50
2.5.6	<i>In vivo</i> -Stabilität von ¹⁸ F-S100A4	51
2.5.7	Bioverteilungsuntersuchungen von ¹⁸ F-S100A4	51
2.5.8	Positronen-Emissions-Tomographie mit ¹⁸ F-S100A4	51
2.6	Zellbiologische Methoden	52
2.6.1	Auftauen und Gefrierkonservierung von Zellen	52
2.6.2	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	53
2.6.3	Bestimmung der Zellzahl	54
2.6.4	Stabile Transfektion von A375-Melanomzellen	54
2.6.5	Durchflusszytometrie	56
2.6.6	Untersuchung der Zellproliferation	57
2.6.7	Untersuchung der Zellmotilität	57
2.6.8	Untersuchung der Zelladhäsion	58
2.6.9	Untersuchung der Zellmigration	59
2.6.10	Untersuchung der Zellinvasion	60
2.6.11	Bestimmung von extrazellulärem S100A4 aus Zellkulturüberständen	61
2.6.12	Bestimmung der NF-κB-Aktivierung in Zellkernextrakten	62
2.7	Tierexperimentelle Untersuchungen	63
2.7.1	Untersuchung des subkutanen Tumorwachstums	63
2.7.2	Untersuchung des Metastasierungsverhaltens	64
2.8	Statistik	64
3	ERGEBNISSE	65
3.1	Herstellung von rekombinantem S100A4-Protein	65
3.1.1	Klonierung des humanen S100A4-Gens in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-6P-1	65
3.1.2	Gewinnung und Reinigung des humanen S100A4-Proteins	67
3.1.3	Identifizierung des humanen S100A4-Proteins	68
3.2	In-vitro-Bindung von S100A4 an sRAGE	69
3.3	Radiopharmakologische Charakterisierung des ¹⁸F-markierten S100A4- Proteins	71

3.3.1	¹⁸ F-Radiomarkierung	71
3.3.2	In-vitro-Bindung an sRAGE.....	73
3.3.3	Assoziation an Melanom- und Endothelzellen	74
3.3.4	Stabilitätsuntersuchungen <i>in vivo</i>	76
3.3.5	Bioverteilungsuntersuchungen in Ratten.....	77
3.3.6	PET-Untersuchungen	79
3.4	Untersuchungen zum Vorkommen von S100A4 und RAGE in Melanomzellen	83
3.5	Generierung von stabil mit S100A4-transfizierten Melanomzellen.....	86
3.5.1	Klonierung des humanen und murinen S100A4-Gens in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1.....	86
3.5.2	Nachweis der stabilen Transfektion von A375-Melanomzellen	89
3.6	Charakterisierung der stabil mit S100A4 transfizierten A375-Melanomzellen	91
3.6.1	Zellproliferation	91
3.6.2	Zellmotilität	92
3.6.3	Zelladhäsion	94
3.6.4	Zellmigration.....	95
3.6.5	Zellinvasion	96
3.6.6	S100A4-Sekretion	97
3.6.7	S100A4-vermittelte Aktivierung von NF-κB und RAGE	99
3.6.8	Tierexperimentelle Untersuchungen	102
4	DISKUSSION.....	105
4.1	Gewinnung von rekombinantem humanem S100A4-Protein	105
4.1.1	Radiomarkierung von rekombinantem S100A4 mit [¹⁸ F]SFB.....	107
4.2	Bindung von S100A4 an RAGE.....	108
4.2.1	In-vitro-Bindung von S100A4 und ¹⁸ F-S100A4 an sRAGE	108
4.2.2	Assoziation von ¹⁸ F-S100A4 an Melanom- und Endothelzellen	111
4.3	<i>In-vivo</i>-Untersuchungen mit ¹⁸F-S100A4	112
4.4	Bedeutung von S100A4 bei Metastasierungsprozessen des malignen Melanoms	114
4.4.1	Nachweis von S100A4 und RAGE in Melanomzellen	114
4.4.2	Charakterisierung der stabil transfizierten A375-Melanomzellen.....	115
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	124
5	ZUSAMMENFASSUNG	127
6	LITERATURVERZEICHNIS	130
7	ANHANG.....	150
7.1	Vektorkarten.....	150
7.2	Aminosäuresequenzen von <i>full length</i> RAGE und sRAGE.....	153
8	VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONFERENZBEITRÄGE	154
9	DANKSAGUNG.....	156
10	VERSICHERUNG UND ERKLÄRUNG	158

Abkürzungsverzeichnis

% ID	Prozent der injizierten Dosis
× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
[¹⁸ F]SFB	<i>N</i> -Succinimidyl-4-[¹⁸ F]fluorbenzoat
¹⁸ F-S100A4	[¹⁸ F]Fluorbenzoyl-S100A4
Aβ	Amyloid-β
A375	humane Melanomzelllinie
A375-mock	humane Melanomzelllinie, stabil mit dem Plasmid pIRES2- AcGFP1 transfiziert
A375-hS100A4	humane Melanomzelllinie, stabil mit dem Plasmid h(uman)S100A4-pIRES2-AcGFP1 transfiziert
A375-mS100A4	humane Melanomzelllinie, stabil mit dem Plasmid m(aus)S100A4-pIRES2-AcGFP1 transfiziert
A375-hRAGE	humane Melanomzelllinie, stabil mit dem Plasmid h(uman)RAGE-pIRES2-AcGFP1 transfiziert
AcGFP	Grün fluoreszierendes Protein (GFP) aus der Qualle <i>Aequorea coerulescens</i> (Ac)
ad	lat. auf (auffüllen)
ADAM10	<i>a disintegrin and metalloprotease 10</i>
AE	Arbiträre Einheit
AGE	Fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (<i>advanced glycation endproducts</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	Amerikanische Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (<i>American Type Culture Collection</i>)
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CCN	Proteinfamilie, CCN steht für die Anfangsbuchstaben der ersten drei beschriebenen Mitglieder: CYR61 (<i>cysteine rich 61</i> , CCN1), CTFG (<i>connective tissue growth factor</i> , CCN2) und NOV (<i>nephroblastoma overexpressed</i> , CCN3)
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
Ct	Schwellenwertzyklus (<i>threshold cycle</i>)
Da	Dalton, nicht SI-konforme Einheit der molaren Masse, die zumeist für hochmolekulare Verbindungen verwendet wird, 1Da = 1 u bzw. 1 g/mol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FKS	Fötales Kälberserum
glykLDL	Glukose-modifiziertes LDL
GST	Glutathion-S-Transferase
GBq	Giga-Bequerel
HAEC	<i>human aortic endothelial cells</i>
hS100A4-pGEX-6P-1	pGEX-6P-1-Vektor mit einem cDNA-Insert für die Expression von humanem S100A4 in Bakterien
hS100A4-pIRES2-AcGFP1	pIRES2-AcGFP1-Vektor mit einem cDNA-Insert für die Expression von humanem S100A4 in Säugetierzellen
hRAGE-pIRES2-AcGFP1	pIRES2-AcGFP1-Vektor mit einem cDNA-Insert für die Expression von humanem RAGE in Säugetierzellen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish</i>)
ID	injizierte Dosis
IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
I κ B	Inhibitorische κ B-Proteine
K _D	Dissoziationskonstante
LB	Luria-Bertani-Medium
LOX-1	<i>Lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1</i>
LPA	Lysophosphatidsäure (<i>lysophosphatidic acid</i>)
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MARCO	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>
MIP	Maximum-Intensitäts-Projektion
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
mS100A4-pIRES2-AcGFP1	pIRES2-AcGFP1-Vektor mit einem cDNA-Insert für die Expression von murinem S100A4 in Säugetierzellen
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze (<i>molecular weight cut off</i>)
NCBI	Nationales Zentrum für Biotechnologie-Information (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NF- κ B	Nukleärer Faktor kappa B
nanoLC-ESI-MSMS	<i>Nano-Liquid-Chromatography electrospray ionisation mass spectrometry</i>
OD _{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Protein-Data-Bank</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pyk-2	Prolinreiche Tyrosinkinase 2
RAGE	Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
SR-A	<i>macrophage class A scavenger receptor</i>
sRAGE	<i>soluble</i> (löslicher) RAGE
SR-B1	<i>Scavenger receptor class B member 1</i>
$t_{1/2}^{d/a}$	Verteilungs- bzw. Gewebe-Assoziations-Halbwertszeit
$t_{1/2}^e$	Eliminierungs-Halbwertszeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
U	Units (alte Einheit zur Angabe der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett

1 EINLEITUNG

Metastasierung – die Ausbreitung von malignen Zellen eines Primärtumors zu entfernten Organen im Körper - ist die bedrohlichste Eigenschaft bösartiger Tumoren. 90% der Patienten mit einer Krebserkrankung versterben an den Folgen der progressiv wachsenden und gegenüber konventionellen Therapien resistenten Metastasen. Die Entwicklung einer Metastase ist ein äußerst komplexes und mehrstufiges biologisches Ereignis, welches die durch Tumorzelle und Mikroumgebung vermittelte Invasion am Ursprungsort, Überleben und Arretierung im Blutstrom sowie progressives Wachstum an einer anderen Stelle umfasst. Das mechanistische Verständnis der Metastasierungsvorgänge sowie ihrer dynamischen Wechselwirkungen wird die Identifizierung von vielversprechenden, molekularen Zielproteinen für die Krebsbehandlung ermöglichen [1-3].

Der Zusammenhang zwischen dem Kalzium-bindenden S100A4-Protein und der Tumormetastasierung ist in der Literatur mehrfach belegt. So ist S100A4 in verschiedene Schritte der Metastasierungskaskade involviert und beeinflusst unter anderem Migrations-, Invasions- und Tumorangiogeneseprozesse. Die exakten molekularen Mechanismen wie S100A4 an der Etablierung eines metastasierenden Phänotyps mitwirkt, sind noch nicht verstanden und daher von aktuellem Forschungsinteresse. Des Weiteren stellt S100A4 für die Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen einen potentiellen Biomarker dar und dessen Interaktion mit RAGE ein putatives Target für radiopharmazeutische Anwendungen.

1.1 Der Metastasierungsprozess

Unter Metastasierung versteht man die Ausbreitung einzelner Tumorzellen eines Primärtumors und deren Entwicklung zu einem neuen Tumor an einer anderen Stelle im Körper. Der Metastasierungsprozess besteht aus verschiedenen, aufeinander folgenden Schritten, die von den disseminierten Tumorzellen vollständig durchlaufen und überlebt werden müssen, damit es zur Bildung von klinisch relevanten Läsionen kommen kann. Im Prinzip sind die für die Metastasierung notwendigen Ereignisse bei jedem Tumor gleich [4]. Der Ausgang des Metastasierungsprozesses wird sowohl von intrinsischen Eigenschaften der Tumorzellen als auch von deren Interaktion mit dem umgebenden Gewebe bestimmt [5]. In **Abbildung 1-1** sind die wichtigsten Metastasierungseignisse gezeigt.

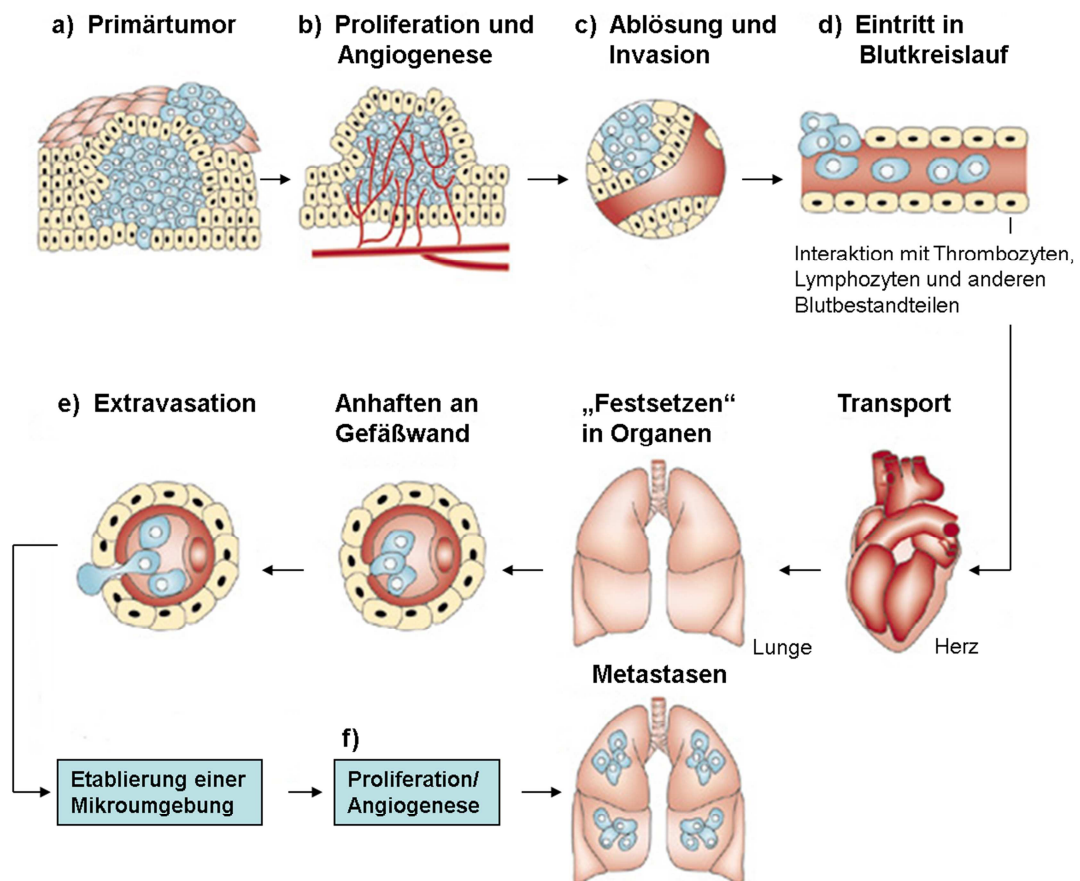


Abbildung 1-1: Die wichtigsten Ereignisse beim Metastasierungsprozess

a) Zelluläre Transformation und progressives Wachstum des Primärtumors. b) Bei einer Tumorgöße über 1-2 mm kommt zur extensiven Vaskularisierung. c) Ablösung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor und lokale Invasion in das umliegende Gewebe. d) Intravasation der Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße und Transport im Blut- bzw. Lymphstrom. Die wenigen Tumorzellen, die in der Zirkulation überlebt haben, adhären an das Endothel im Kapillarbett des entfernten Organs. e) Extravasation: Tumorzellen durchdringen das Endothel und adaptieren sich an die Umgebung im Zielorgan. f) Proliferation der Tumorzellen im neuen Organparenchym und Auswachsen zu einer Metastase. (modifiziert nach Fidler et al. [1])

Zunächst finden Transformation und progressives Wachstum der neoplastischen Zellen statt; dabei wird die expandierende Primärtumormasse mit Nährstoffen durch einfache Diffusion versorgt **(a)**. Bei einer Tumorgroße über einen Durchmesser von 1-2 mm kommt es zur extensiven Vaskularisierung [6]. Die Synthese und Sekretion verschiedener pro-angiogener Faktoren von Tumor- und infiltrierenden Gewebezellen führen, ausgehend vom umgebenden Gewebe, zur Entwicklung eines kapillaren Netzwerkes [6] **(b)**. Daraufhin findet durch verschiedene parallele, biochemische Ereignisse die lokale Invasion einiger Tumorzellen in die extrazelluläre Matrix des umgebenden Gewebes statt. Dabei haften Tumorzellen an Zelloberflächen-Rezeptoren, die spezifisch an Matrix-Komponenten binden, wie z. B. Laminin an die Basalmembran oder Fibronectin an das Stroma. Die verankerten Tumorzellen sezernieren hydrolytische Enzyme, wie z.B. Kollagenasen oder induzieren Gewebezellen zur Sekretion von Enzymen, wodurch es zur lokalen Degradierung der extrazellulären Matrix kommt [7]. Dünnwandige kleine Venen und lymphatische Kanäle stellen nur einen geringen Widerstand für die Tumorzellinvasion dar und werden somit am häufigsten für den Eintritt der Tumorzellen in die Zirkulation von Blut bzw. Lymphe genutzt [1] **(c)**. In den Blut- oder Lymphgefäßen werden einzelne Tumorzellen bzw. Tumorzellaggregate fortgeschwemmt und im Organismus verteilt. Allerdings gehen die meisten Tumorzellen aufgrund von Angriffen durch das Immunsystem sowie hohen Scherkräften in der Zirkulation schnell zugrunde. Es wurde gezeigt, dass innerhalb von 24 Stunden nach Eintritt in die Zirkulation weniger als 0,1% der Tumorzellen am Leben sind und von diesen Zellen weniger als 0,01% im Blut- bzw. Lymphkreislauf überleben und Metastasen ausbilden können [8]. Die meisten der überlebenden Tumorzellen werden aufgrund ihrer Größe in kleinen Kapillaren zurückgehalten und überleben durch die Interaktion mit Blutbestandteilen in der Zirkulation. Diese Zellen adhärieren an Endothelzellen oder direkt an die freiliegende subendotheliale Basalmembran und werden so im Kapillarbett des entfernten Organs eingeschlossen [9] **(d)**. In einem als Extravasation bezeichneten Vorgang verlassen die Tumorzellen das Endothel und wandern in das Zielorgan ein, wobei ähnliche Mechanismen wie bei der Invasion zum Tragen kommen **(e)**. Nach Adaption der Tumorzellen an die neue Mikroumgebung proliferieren einige, wenige Zellen im Organparenchym und wachsen zu einer Metastase [1] **(f)**.

1.2 S100-Proteine

Die S100-Proteinfamilie besteht aus Kalzium-bindenden Proteinen vom EF-Hand-Typ. Mit derzeit 25 beschriebenen Mitgliedern bilden sie die größte Unterfamilie der EF-Hand-Proteine beim Menschen. Dazu gehören S100A1 bis S100A18, S100B, S100P, S100Z, Calbindin 3 (S100G), Trichohyalin, Filaggrin und Repetin [10]. Der erste Vertreter wurde 1965 von Moore und Kollegen aus Rinderhirn isoliert und aufgrund der Löslichkeit in gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung „S100“ benannt (engl. *soluble in 100% ammonium sulfate*) [11]. Einige Jahre später stellte sich heraus, dass es sich bei „S100“ um die beiden Proteine S100A1 und S100B handelte [12]. Die Gene von 21 Familienmitgliedern sind auf einem engen Cluster auf der Chromosomenregion 1q21 kodiert [10]. Die gegenwärtige Nomenklatur der S100-Proteinfamilie orientiert sich im Wesentlichen an der Organisationsstruktur ihrer Gene auf diesem Cluster. Die Gene werden hinter dem Stammsymbol S100 mit einem A gekennzeichnet und gemäß ihrer Position in Leserichtung auf dem kodierenden DNA-Strang fortlaufend nummeriert (S100A1, S100A2 etc.) [13]. Weitere Gene für S100-Proteine befinden sich auf den Chromosomen 4p16 (S100P), 5q14 (S100Z), 21q22 (S100B) und Xp22 (S100G) [10]. Die entsprechenden Äquivalente in der Maus und Ratte befinden sich auf den Chromosomen 3f3 und 2q34 [14].

S100-Proteine haben eine niedrige molekulare Masse (9-13 kDa) und einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren. Sie kommen ausschließlich in Vertebraten vor und sind als multifunktionale Proteine an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Kontraktion, Motilität, Zellwachstum, Differenzierung, Zellzyklusprogression, Transkription und Sekretion beteiligt. Daher sind veränderte S100-Proteinspiegel mit verschiedenen Krankheiten wie Kardiomyopathien, neurodegenerativen und inflammatorischen Erkrankungen sowie Krebs assoziiert [15, 16].

1.3 S100A4

1.3.1 Proteinstruktur

S100A4 stellt wie die meisten S100-Proteine ein symmetrisches, antiparalleles Homodimer dar. Eine Untereinheit ist durch zwei unterschiedliche EF-Hand-Kalzium-Bindungsdomänen charakterisiert, die über eine zentrale Scharnierregion (*hinge*) miteinander verbunden sind (**Abbildung 1-2**). Jede EF-Hand besteht aus einer kalziumbindenden Schleife (*Loop*), die von zwei α -Helices (E- und F-Helix) flankiert wird und stellt somit ein Helix-Loop-Helix-Motiv dar. Die C-terminale EF-Hand enthält

das klassische (kanonische) Kalzium-Bindungsmotiv (L2), welches alle EF-Hand-Proteine gemeinsam haben. Es besteht typischerweise aus 12 Aminosäuren, die von den Helices III und IV umgeben sind. Diese EF-Hand 2 zeigt eine hohe Kalzium-Bindungsaffinität ($K_D = 2,6 \mu\text{M}$), die vorwiegend durch die Seitenketten von Aspartat 63, Asparagin 65, Aspartat 67, und Glutamat 69 (beide Sauerstoffatome), durch den Carbonylsauerstoff von Glutamat 74 sowie durch ein Wassermolekül gewährleistet wird. Die N-terminale EF-Hand-Domäne besteht aus den Helices I und II, die über eine Schleife von 14 Aminosäuren (L1) miteinander verbunden sind. Die Koordination von Kalzium erfolgt schwach über Carbonylsauerstoffatome von Serin 20, Glutamat 23, Aspartat 25, und Lysin 28 der Hauptkette, über Seitenketten des Carboxylats von Glutamat 33 (beide Sauerstoffatome) sowie durch ein Wassermolekül ($K_D = 574 \mu\text{M}$). Diese EF-Hand unterscheidet sich vom klassischen EF-Hand-Motiv und wird daher als nicht-kanonisch, pseudo-EF-Hand oder S100-Hand bezeichnet, da auch andere Mitglieder der S100-Proteinfamilie eine ähnliche Konformation besitzen. Die Carboxy-terminale Endregion im Anschluss an Helix IV ist beim S100A4-Protein im Vergleich zu anderen S100-Proteinen recht lang und weist eine sehr basische Aminosäurezusammensetzung auf. Innerhalb der S100-Proteinfamilie zeigen die C-terminalen Enden sowie die Scharnierregionen hohe Sequenzvariabilität und sind daher wahrscheinlich an der Interaktion mit anderen Proteinen beteiligt [17-19]. S100A4 besteht aus 101 Aminosäuren und die molekulare Masse des nativen Proteins beträgt 11.646 Da [20].

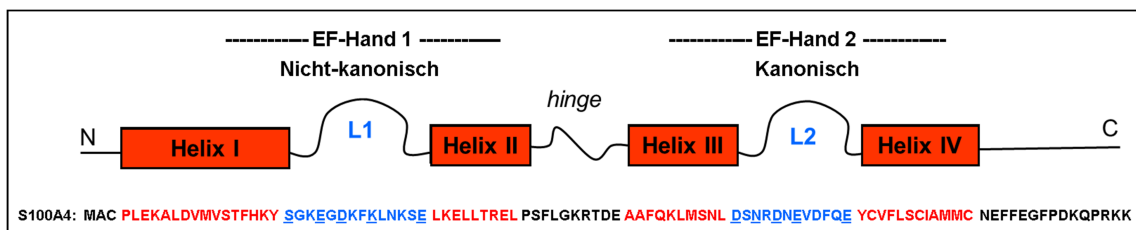


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur einer monomeren S100-Untereinheit und die Aminosäuresequenz von S100A4

Ein Monomer besteht aus zwei EF-Hand-Motiven (Helix-Loop-Helix), die durch eine Scharnierregion (*hinge*) miteinander verbunden sind sowie einer C- und N-terminalen Domäne. Bei jeder EF-Hand wird die Kalzium-Bindungsschleife (*Loop 1* bzw. *2*, blau markiert) durch zwei α -Helices (N-terminal durch Helix I und II, C-terminal durch Helix III und IV, rot markiert) flankiert. Die Aminosäuren zur Koordination von Kalzium sind unterstrichen. (modifiziert nach Eckert et al. [21])

Das symmetrische S100A4-Homodimer wird durch nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen zwei Helices von jeder Untereinheit stabilisiert (Helices I, IV; I', IV'), wodurch ein vier-Helix-Bündel vom X-Typ entsteht (**Abbildung 1-3 A**). Die beiden EF-Hand-

Domänen jeder Untereinheit werden durch ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt in unmittelbare Nähe zueinander gebracht [22, 23].

Jedes S100A4-Monomer bindet zwei Ca^{2+} -Ionen. Wie bei den meisten S100-Proteinen kommt es durch die Bindung von Kalzium zu einer deutlichen Konformationsänderung in der kanonischen EF-Hand. Dabei rotiert Helix 3 von jeder Untereinheit um ungefähr 60° relativ zu Helix 4, und führt in jedem Monomer zur Exposition einer hydrophoben Bindungsstasche, die aus Aminosäuren von Helix III und IV, der *hinge*-Region sowie der C-terminalen Schleife 2 (Loop bzw. L2) besteht (**Abbildung 1-3 rechts**). Für die Interaktion mit anderen Proteinen und die biologische Aktivität von S100A4 ist diese kalziumabhängige Konformationsänderung notwendig. Die Bindung an Zielproteine führt zu einer deutlichen Erhöhung der Kalzium-Bindungsaffinität von S100A4 ($K_D \sim 0,2 \mu\text{M}$) [24]. Dementsprechend liegen S100A4 und viele andere S100-Proteine, die Kalzium binden, in der kalziumfreien Apo-Form als inaktive, geschlossene Konformation vor und nach der Bindung von Kalzium in der aktiven, offenen Konformation [25].

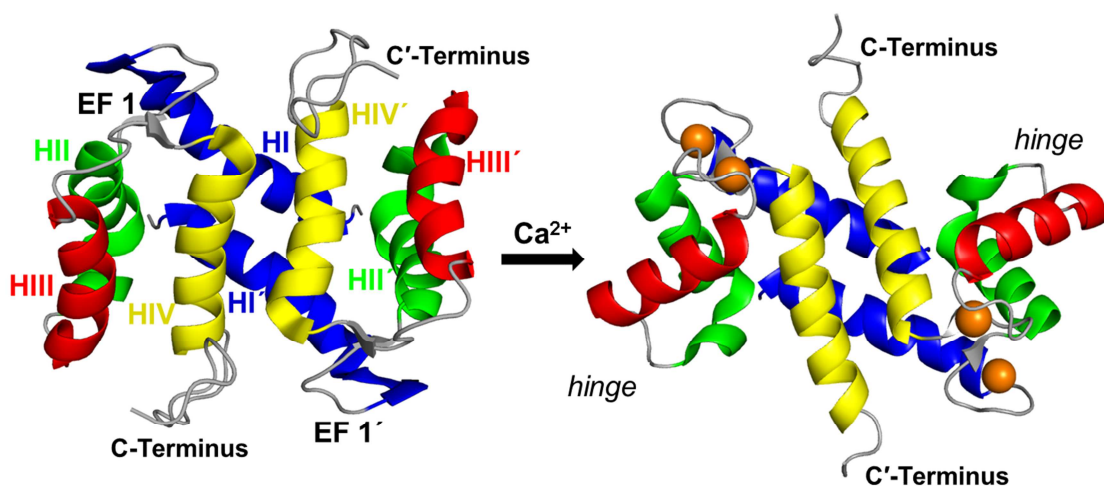


Abbildung 1-3: Struktur von Apo-S100A4 (links) und Ca^{2+} -S100A4 (rechts)

Zwei homologe S100A4-Untereinheiten bilden ein symmetrisches Dimer. Links ist das S100A4-Dimer ohne Kalzium, rechts nach der Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen (orange Kugeln) gezeigt, wobei die Rotation der Helix III deutlich wird. Die Helices sind farblich dargestellt: Helices HI und HI' (blau), HII und HII' (grün), HIII und HIII' (rot), sowie HIV und HIV' (gelb) und formen ein vier-Helix-Bündel vom X-Typ. EF = EF-Hand. Die Strukturen wurden mit dem Programm PyMOL und den PDB-Einträgen 1M31 (Apo-S100A4, NMR-Lösungsstruktur) [22] und 3C1V (Ca^{2+} -S100A4) [26] erstellt.

Die Kalzium-gebundene Struktur von S100A4 ähnelt sehr den Strukturen von S100A6 und S100B. Die drei Proteine weisen eine hohe Sequenzhomologie auf und die Konformationen der Kalzium-Bindungsmotive sowie ihre relativen Orientierungen sind identisch [26].

1.3.2 Entdeckung und Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung

In den 1980- und frühen 1990er Jahren klonierte eine ganze Reihe von Forschergruppen unabhängig voneinander das S100A4-Gen, wodurch es eine Vielzahl von Bezeichnungen erhielt. Es wurde unter anderem beschrieben als p9Ka [27, 28], 18A2 [29, 30], pEL98 [31], 42A [32], Metastasin-1 (Mts1) [33], Calvasculin [34], CAPL [35] sowie Fibroblasten-spezifisches Protein (FSP1) [36]. Bei diesen ersten Experimenten wurde S100A4 unter anderem als hoch exprimiertes Transkript in wachstumsstimulierten Zellkulturen [29, 31], in metastasierenden Tumorzelllinien [33] sowie während der morphogenen Umwandlung von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp [36] nachgewiesen. Des Weiteren wurde die Heraufregulierung der S100A4-Expression und -Synthese während der onkogenen Transformation von verschiedenen Zelllinien gezeigt [37, 38]. Schon zu dieser Zeit fiel die mögliche Assoziation zwischen der S100A4-Expression und der Zellproliferation sowie Tumorprogression auf.

In den folgenden Jahren wurde eine verstärkte S100A4-Synthese auf Protein- und mRNA-Ebene bei einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen. Im Vergleich zu Normalgewebe zeigten unter anderem Brust- [39, 40], Pankreas- [41], Prostata- [42], Gallenblasen- [43], Speiseröhren- [44], Magen- [45, 46], Kolorektal- [47, 48], Lungen- [49] und Schilddrüsenkarzinome [50] eine signifikant höhere S100A4-Expression und -Synthese, wodurch deutlich wurde, dass ein erhöhter S100A4-Status zur Manifestation eines metastasierenden Phänotyps beiträgt. So induzierte die Überexpression von S100A4 in eigentlich nicht-metastasierenden Zelllinien einen metastasierenden Phänotyp [51, 52] und in *Knockdown*-Experimenten, bei denen die S100A4-Expression inhibiert wurde, zeigten die S100A4-exprimierenden Tumorzellen eine verminderte Metastasierungskapazität [53, 54]. S100A4 ist an sich nicht tumorigen, da transgene Mäuse, die in Brustepithelien S100A4 überexprimieren sich phänotypisch nicht von Wildtyp-Mäusen unterscheiden [55]. Jedoch verursacht die S100A4-Überexpression in transgenen Brustkrebs-Mausmodellen äußerst aggressive und invasive Primärtumore, die zur Bildung von Metastasen in der Lunge führen [55, 56]. Des Weiteren wurde bei etlichen Krebserkrankungen festgestellt, dass die Überexpression von S100A4 und die damit verbundene Metastasierung des Tumors eine ungünstige Prognose für die Überlebenschancen des Patienten darstellt. Daher scheint S100A4 als potentieller prognostischer Marker unter anderem für Tumore der Brust [57-59] und des Magens [45, 46, 60], für Plattenepithelkarzinome der Speiseröhre [44], maligne Melanome [61], sowie für Lungen- [49, 62], Prostata- [63],

Blasen- [64, 65], Kolorektale- [60, 66-68], Nierenzell- [69] und Pankreaskarzinome [70, 71] geeignet.

1.3.3 Subzelluläre Lokalisation und Gewebeverteilung

Verschiedene Arbeiten belegen das Vorkommen von S100A4 sowohl innerhalb der Zelle, im Zytoplasma [72-74] und Zellkern [74-77] als auch im Extrazellulärraum [78-84] bei normalen und neoplastischen Zellen. Ebenso wurde extrazelluläres S100A4-Protein in der Interstitialflüssigkeit von humanen Brusttumoren (ca. 1100 ng/mg) [83], im Blutplasma und in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Plasma: ca. 1000ng/ml; Synovia: 2000-7000 ng/ml) und Arthrose (Plasma: ca. 200 ng/ml; Synovia: ca. 1100ng/ml) [85] sowie im Blut von normalen Mäusen (40-60 ng/ml) und alternden S100A4-transgenen Tieren (100-120 ng/ml) detektiert [78]. Die S100A4-mRNA-Expression und -Proteinbiosynthese wurde in verschiedenen normalen Mausgeweben, die reich an lymphoiden Zellen wie Milz, Thymus, und Knochenmark sind, nachgewiesen. Geringe Mengen an S100A4 wurden ebenso in der Lunge und in der Haut gefunden. In murinen und menschlichen Blutzellen zeigten vor allem invasive Zellen wie Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten eine S100A4-Expression und -Proteinbiosynthese im Zytoplasma [86-88]. Des Weiteren wurde eine hohe S100A4-mRNA-Expression in humanem Lungengewebe und ein sehr geringes S100A4-Expressionsniveau in den Organen Niere, Plazenta, gestreifter Muskel, Ovarien, Haut und Brustdrüse detektiert [89]. In Rattengewebe wurde S100A4-Protein intrazellulär in glatten Muskelzellen, braunem Fettgewebe, Leber, einigen absorptiven und keratinisierten Epithelien, in den säureproduzierenden Belegzellen des Magens, in Nervenzellen des vegetativen Nervensystems sowie in einigen Zellen von Organen des Immunsystems wie Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Blut detektiert. Auf zellulärer Ebene zeigten besonders die glatten Muskel- und Endothelzellen von Arterien und Venen eine hohe S100A4-Verteilung [79]. Während der Mausentwicklung wurde S100A4 vor allem in embryonalen Makrophagen und in differenzierendem mesenchymalen Gewebe nachgewiesen [90].

1.3.4 Interaktionspartner und mögliche biologische Funktion

Bislang wurden einige intrazelluläre Proteine im Komplex mit S100A4 identifiziert. Die Interaktion zwischen S100A4 und verschiedenen Zytoskelett-Proteinen wie F-Aktin [91], nicht-muskulärem Myosin/Myosin IIA [92-97], nicht-muskulärem Tropomyosin [72] und Liprin β 1 [98] assoziiert S100A4 mit Zellmotilitäts- und Adhäsionsprozesse.

S100A4 interagiert auch mit dem p53-Tumor-Suppressor-Protein und reguliert dessen Transkriptionsaktivitäten, wodurch verschiedene p53-Zielgene zellspezifisch exprimiert werden [99]. Allerdings wurde erst kürzlich die p53-S100A4-Interaktion und die damit verbundenen biologischen Effekte äußerst kritisch hinterfragt [100]. Als weitere Bindungspartner, die an den Metastasen-fördernden Effekten von S100A4 beteiligt sind, wurden außerdem p37 [24], S100A1 [101], die Methionin-Aminopeptidase [102] und CCN3 [103] beschrieben. Für die Interaktion von S100A4 mit anderen Proteinen wurde eine Kalzium-Abhängigkeit beobachtet, wodurch die zelluläre Funktion von intrazellulären Kalzium-Konzentrationen abhängig ist. Allerdings wurden ebenso kalzium-unabhängige Bindungen mit S100A4, z. B. für nicht-muskuläres Myosin und p53 beschrieben, wodurch sich neue Bindungsstellen im S100A4-Molekül ergeben würden [104].

Die Applikation von exogenem, rekombinantem S100A4 führt zu einer Vielzahl von zellulären Antworten in verschiedenen Zelltypen. So stimuliert extrazelluläres S100A4-Protein die Differenzierung von hippocampalen Neuronen bei Ratten [105], Angiogeneseprozesse [74, 78] sowie die Migration von astrozytischen Tumorzellen [106], und es verhindert die Mineralisierung der Zahnwurzelhaut bei der Ratte [81]. Zudem vermag zugeführtes, extrazelluläres S100A4-Protein, Krebszellen für die durch IFN- γ vermittelte Apoptose zu sensibilisieren [80]. Des Weiteren wurde die Assoziation von S100A4 mit der Aktivität verschiedener Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihren endogenen Inhibitoren (*tissue inhibitors of MMPs*; TIMPs) beschrieben, wodurch sich die S100A4-vermittelte Steigerung der Tumorprogression durch die Steuerung des Umbaus der extrazellulären Matrix erklären ließe [82, 107-110]. So führt ebenso unter nicht-malignen Bedingungen, wie bei rheumatoider Arthritis und Arthrose extrazelluläres S100A4 zu einer Heraufregulierung der mRNA-Expression und Proteinbiosynthese von MMPs [111, 112]. Im Hinblick auf Signaltransduktionsprozesse, die den S100A4-induzierten Effekten zugrunde liegen, konnte bisher in verschiedenen Zellsystemen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch extrazelluläres S100A4 nachgewiesen werden [80, 107], wobei vermutlich der klassische NF- κ B-Aktivierungsweg verfolgt wird [113, 114]. Ebenso stimulierte S100A4 die MAP-Kinasen p38, die extrazellulär signalregulierten Kinasen (ERK) und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) [115].

Aufgrund des extrazellulären Vorkommens von S100A4 wurde ebenso dessen Interaktion mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren diskutiert. So kommen unter anderem der Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (RAGE) [115, 116], Annexin II [74] sowie Heparansulfat-Proteoglykane [116] in Frage. Die biologische

Aktivität von extrazellulärem S100A4 ist vorwiegend mit den multimeren Formen des Proteins assoziiert [78, 105, 116], aber auch für das dimere S100A4-Protein wurde extrazelluläre Aktivität beschrieben [115].

1.4 RAGE

Als zellulärer Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (AGE, *advanced glycation endproducts*) wurde Anfang der 1990er Jahre zunächst RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*) aus der Rinderlunge isoliert und als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie von Zelloberflächenmolekülen charakterisiert [117, 118]. Nachfolgende Untersuchungen zeigten deutlich, dass RAGE ein Multiliganden-System darstellt und aufgrund der Bindung einer Vielzahl verschiedenster Liganden auch als „*pattern recognition receptor*“ bezeichnet wird [119]. Weitere Liganden von RAGE sind neben AGEs, Mitglieder der S100-Familie [120-125], HMGB1 (*high mobility group box-1* = Amphoterin) [126], Amyloid-Fibrillen [127] sowie das β 2-Integrin Mac-1 [128].

1.4.1 Vorkommen und Lokalisation von RAGE

Während ein sehr hohes basales Vorkommen von RAGE in der Lunge detektiert wurde, zeigten die meisten Gewebe wie Leber, Gehirn, Herz, Niere und Skelettmuskel bei der Kuh ein mäßig niedriges Niveau von RAGE-Protein und -mRNA [129]. Beim Menschen zeigte ebenso die Lunge die höchste RAGE-mRNA-Expression, wobei die anderen Organe kaum RAGE-Transkripte aufwiesen [130]. Auf zellulärer Ebene wurde RAGE in Endothel-, glatten Muskelzellen der Blutgefäße und den meisten peripheren mononukleären Blutzellen, in Alveolarepithelzellen (Typ 1) der Lunge sowie in Podozyten der Niere nachgewiesen [129-131].

Eine Heraufregulierung von RAGE wurde bei etlichen pathologischen Zuständen wie Diabetes [131, 132], Herz-Kreislauf-Erkrankungen [129, 133, 134], rheumatoider Arthritis [135], Krebs [136] und neuronaler Dysfunktion [127, 137] beobachtet. In dieser Hinsicht stellen Lungentumore und die idiopathische Lungenfibrose eine Ausnahme dar, denn ausgehend von einer hohen RAGE-mRNA-Expression und -Proteinbiosynthese im gesunden Lungengewebe wurde bei diesen Erkrankungen eine geringere bzw. sogar fehlende RAGE-Expression auf mRNA- und Proteinebene festgestellt [138, 139].

1.4.2 Struktur von RAGE

Der kanonische *full length*-RAGE-Rezeptor hat, abhängig vom Glykosilierungszustand, eine molekulare Masse zwischen 45-50 kDa und besteht mit 404 Aminosäuren aus einer extrazellulären Liganden-Bindungs-Domäne (321 Aminosäuren), einer einzelnen Transmembran-Helix (19 Aminosäuren) und einer kurzen zytoplasmatischen Region (41 Aminosäuren) für die Signalweiterleitung in das Innere der Zelle. Im extrazellulären Teil befinden sich eine kurze Signalsequenz sowie drei Immunglobulin-ähnliche Domänen, die variable V-Domäne sowie zwei konstante C-Domänen, die mit C1 und C2 bezeichnet werden (**Abbildung 1-4**) [118]. Ursprünglich wurde die V-Domäne des Rezeptors als Ort für die Liganden-Bindung identifiziert [140]. Jedoch belegen neuere Arbeiten, dass die V- und C1-Domäne zusammen eine fest verbundene Struktureinheit bilden (VC1), woran unter anderem S100B bindet. Die C2-Domäne ist von der V- und C1-Domäne strukturell unabhängig und durch einen flexiblen Linker an die VC1-Untereinheit gebunden und ebenso zur Ligandenbindung fähig [123, 141, 142]. RAGE besitzt zwei N-Glykosylierungsstellen in der V-Domäne, die vermutlich einzigartige Liganden-Bindungsseiten darstellen und somit möglicherweise zu den vielfältigen Bindungsfähigkeiten des Rezeptors beitragen [143].

Von RAGE existieren eine ganze Reihe von *Splice*-Varianten, welche 2008 nach den Richtlinien des *HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)* als RAGE und RAGE_v1-v19 klassifiziert wurden [144]. **Abbildung 1-4** zeigt die am häufigsten vorkommenden humanen Isoformen: *full length*-RAGE (RAGE) und die sezernierte, lösliche (*soluble*) Form von RAGE, RAGE_v1 (vorherige Bezeichnung: *endogenous secretory* RAGE, *C-truncated* RAGE, sRAGE, sRAGE2/3). Der RAGE_v1-Isoform fehlt die Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, sie ist aber durch eine einzigartige C-terminale Sequenz charakterisiert. RAGE_v1 wird durch alternative *Splicing*-Prozesse erzeugt [144]. Daneben wird für die Generierung von löslichen RAGE-Isoformen auch die proteolytische Spaltung des membranständigen *full length*-RAGE-Rezeptors vorgeschlagen. Dabei erfolgt die Entfernung des extrazellulären Rezeptorteils von der Membranoberfläche durch die Proteasen ADAM10, MMP-9 sowie die γ -Sekretase [145-147]. Im Extrazellulärraum wirken die löslichen RAGE-Isoformen als sogenannte „Köder-Rezeptoren“, da sie mit freien RAGE-Liganden interagieren und dadurch deren Bindung mit dem Zelloberflächenrezeptor RAGE verhindern [120, 148-151].

In der vorliegenden Arbeit wird der membranständigen *full length*-RAGE als RAGE und die lösliche, rekombinant hergestellte RAGE-Isoform als sRAGE bezeichnet.

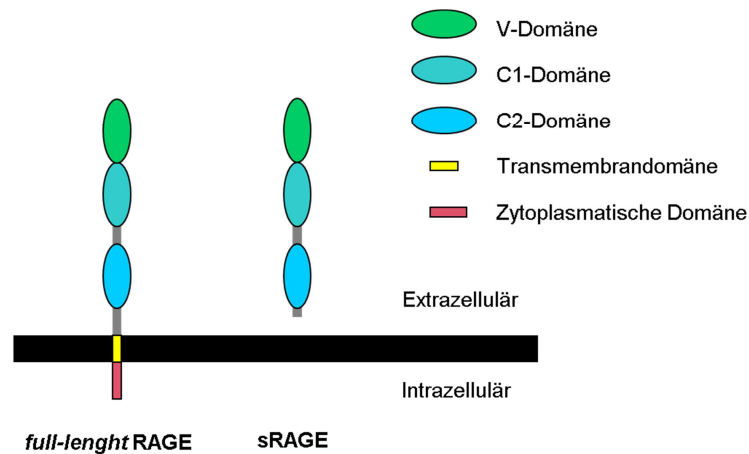


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung von *full-length* RAGE und sRAGE

Der extrazelluläre Teil besteht aus drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen, die V-, C1- und C2-Domäne. Eine einzelne Transmembran-Helix verbindet die extrazellulären Domänen mit der kurzen intrazellulären Domäne. Der löslichen Form von RAGE, sRAGE fehlt die Zytosoma- und die Transmembrandomäne. (modifiziert nach [152])

1.4.3 RAGE-vermittelte-Signaltransduktion

Die Bindung von Liganden an RAGE aktiviert je nach Zelltyp und pathologischem Zustand eine Vielzahl von Signalkaskaden. Diese beinhalten reaktive Sauerstoffspezies (H_2O_2 , O_2^-), p21ras, Mitglieder der MAPK-Familie, die Rho-GTPasen Rac-1 und Cdc42, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), den JAK/STAT-Signalweg sowie verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, Egr-1, AP-1 und STAT3 [120, 140, 150, 153-159]. Der exakte Mechanismus für die Signalweiterleitung von der zytosomatischen RAGE-Domäne weiter in das Zellinnere ist noch nicht vollständig geklärt, aber anscheinend bildet die Interaktion der Zytosoma-Domäne mit Diaphanous-1 (Dia-1) die Grundlage für intrazelluläre RAGE-Signaltransduktionsprozesse [159]. An der Zellplasmamembran wurden konstitutive RAGE-Homooligomere beobachtet [160], die vermutlich RAGE-Homodimere darstellen und für deren zu Stande kommen die V-Domäne unerlässlich ist. Zudem wird angenommen, dass diese Homodimere eine erhebliche Rolle bei der Ligandenerkennung und Aktivierung von RAGE-Signalwegen spielen [161].

Die für RAGE bedeutsamen Signalwege führen zur Induktion verschiedener pro-inflammatorischer Gene und damit zu zellulären, phänotypischen Veränderungen wie Migration, Invasion, Proliferation und Apoptose. Darüber hinaus unterliegt RAGE in Gegenwart seiner Liganden einem positiven Feedback-Mechanismus, wodurch seine eigene Genexpression und Synthese aktiviert [133, 150, 159].

1.5 S100A4-RAGE-Interaktion

S100A12 wurde als erstes RAGE-bindendes S100-Protein identifiziert [120]. Als weitere Bindungspartner von RAGE aus der S100-Proteinfamilie wurden S100B, S100A1, S100A2, S100A5, S100A6, S100A4, S100A7, S100A8/A9, S100A11, S100A13 und S100P nachgewiesen [125].

Die Interaktion zwischen S100A4 und RAGE wurde mit Hilfe eines *Pull-down*-Experimentes an RAGE-synthetisierenden Chondrozyten gezeigt. Zudem führte die Aktivierung von RAGE durch S100A4 zur Auslösung von RAGE-spezifischen Signalkaskaden, welche die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die gesteigerte Phosphorylierung von Pyk-2 und verschiedener MAP-Kinasen (ERK-1/2, p38, JNK) beinhalteten. Dies resultierte in der Aktivierung von NF- κ B und zur Zunahme der MMP-13-Synthese [115]. Die direkte Interaktion von S100A4 und RAGE wurde mit den rekombinanten Proteinen durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Untersuchungen nachgewiesen [116]. Außerdem wurde beobachtet, dass S100A4 die Proliferation und Migration von humanen glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien in Abhängigkeit von RAGE moduliert [162, 163]. Des Weiteren zeigen Immunfluoreszenzaufnahmen die Kolo-kalisation von S100A4 und RAGE im Zytoplasma von humanen Brustadenokarzinomzellen [164]. Ebenso ist RAGE an der intrazellulären Translokation von S100A4 nach Zugabe des extrazellulären Proteins in Endothelzellen beteiligt [77].

Allerdings wurden auch S100A4-vermittelte Effekte beschrieben, die von RAGE unabhängig sind. Dies wurde unter anderem bei der Migration von astrozytischen Tumorzellen [106], bei Neuritenwachstum von primären hippocampalen Ratten-Neuronen [116] sowie bei der Stimulation von invasivem, kapillarähnlichem Wachstum mikrovaskulärer Endothelzellen [107] und teilweise bei der Aktivierung von NF- κ B gezeigt [107, 114].

1.6 Malignes Melanom der Haut

Das maligne Melanom (Schwarzer Hautkrebs) ist ein bösartiger Tumor, der sich aus den pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten, entwickelt. Diese spezialisierten Zellen produzieren in spezifischen Organellen (Melanosomen) das Pigment Melanin, welches für die Eigenfarbe von Haut und Haar verantwortlich ist und die Haut vor UV-Strahlung durch die Absorption von Photonen schützt [165]. Die Melanozyten der Haut stammen von hochmotilen Neuralrohr-Vorläufern ab und wandern während der Fetogenese in die Haut ein. Dort befinden sie sich in der Basalschicht von Epidermis

und Haarfollikeln. Aufgrund des spezifischen Vorkommens der Melanozyten manifestieren sich etwa 90% der Melanome primär an der Haut (kutan Melanom), während 5% von extrakutanen Lokalisationen wie den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes, sowie von der Uvea des Auges ausgehen (mukosales und uveales Melanom). Bei weiteren 5% der Patienten mit metastasierendem Melanom lässt sich kein Primärtumor nachweisen [166].

Das maligne Melanom ist der lebensbedrohlichste Tumor der Haut und aufgrund kontinuierlich steigender Inzidenz und Sterberate, insbesondere bei stark sonnenexponierten hellhäutigen Bevölkerungsgruppen, wird die Erkrankung als großes Gesundheitsproblem erachtet. Nach Angaben der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) erkrankten im Jahr 2008 weltweit 197.000 Männer und Frauen an einem malignen Melanom und 46.000 Patienten verstarben daran. Die höchste Erkrankungsrate hat Australien mit 54 pro 100.000 Personen zu verzeichnen. In der Europäischen Union liegt die Rate bei etwa 14 Neuerkrankungsfällen pro 100.000 Personen [167, 168]. Für Deutschland verzeichnete das Robert-Koch-Institut im Jahr 2008 fast 18.000 Neuerkrankungen, wobei Männer (8.910) und Frauen (8.890) ungefähr zu gleichen Teilen betroffen sind. Dies entspricht einer Erkrankungsrate von etwa 17 pro 100.000 Personen und einer Sterberate von 2,5 Männern bzw. 1,6 Frauen pro 100.000 Einwohner [169]. In Afrika und Südasien ist das Melanom mit < 2 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen hingegen selten [170].

Hautmelanome entstehen zumeist auf einer vorher nicht auffallend veränderten Haut. Die Erkrankung kann aber auch von einem bereits bestehenden Pigmentmal (Nävi) ausgehen. Dabei sind Individuen mit hoher Nävuszahl und Träger von Melanomvorläufern, sogenannten dysplastischen und kongenitalen Nävi, besonders gefährdet. Der wichtigste exogene Risikofaktor ist die natürliche oder künstliche UV-Exposition, vor allem im Kindes- und Jugendalter. UV-B- und UV-A-Strahlung kann zu Mutationen in Genen führen, die für die Kontrolle der Zellteilung und des Zellwachstums verantwortlich sind. Dazu zählen eine ganze Reihe von Onkogenen (z. B. BRAF, NRAS, AKT3), Tumorsuppressorgenen (z. B. CDKN2A, PTEN, APAF-1, p53) und andere Gene, die an der Steuerung wichtiger Signalkaskaden beteiligt sind [169, 171, 172]. Die Sequenzierung des Genoms einer menschlichen Melanom-Metastase zeigte, dass der Großteil der nachgewiesenen Mutationen UV-spezifisch ist [173]. Ebenso treten 5-10% der Melanome aufgrund von polygenen Erbfaktoren in erblich belasteten Familien auf [174].

Etwa 90% der malignen Melanome werden als primäre Melanome ohne Hinweise auf Metastasierung diagnostiziert. Das maligne Melanom zeigt im Verhältnis zur

Tumormasse eine frühe Tendenz zur Metastasierung, die zu über 90% über die Lymphbahnen erfolgt. Dadurch ergibt sich für die Erkrankung eine ungünstige Prognose. Sobald Lymphknotenmetastasen auftreten, sinkt die 10-Jahres-Überlebensrate von 80 bis 75% auf 40 bis 20 %. Im fernmetastasierten Stadium liegt das mittlere Überleben bei 9-12 Monaten. Fernmetastasen entstehen hämatogen und finden sich vorwiegend in Lunge und Haut, jedoch kann in späteren Stadien nahezu jedes Organ und Gewebe betroffen sein. Bei über 80% der autopsierten Fälle waren Hirnmetastasen vorhanden [166, 170, 174].

1.6.1 Die Rolle von S100A4 und RAGE beim malignen Melanom

Verschiedene Forschungsgruppen untersuchten die mRNA-Expression und Proteinbiosynthese von S100A4 und RAGE beim malignen Melanom.

S100A4

Maeldandsmo und Kollegen detektierten bei verschiedenen malignen Melanomzelllinien von primären und metastatischen Läsionen nur geringe bzw. keine S100A4-Expression. Davon zeigte eine Primärzelllinie eine äußerst geringe S100A4-Expression und bei den Zelllinien metastatischen Ursprungs konnte bei einer Zelllinie ein hohes und bei zwei Zelllinien ein geringes S100A4-Expressionsniveau nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden 45 Metastasen-Biopsien und 20 gutartige Nävi analysiert. Dabei wurde S100A4 in 35 (78%) der Biopsien nachgewiesen, wovon nur 17 Biopsien ein hohes S100A4-Expressionsniveau zeigten. Es konnten weder deutliche Unterschiede in der S100A4-Expression zwischen Metastasen und gutartigen Nävi, noch signifikante Korrelationen zwischen der S100A4-Expression und klinischen Parametern festgestellt werden [89].

Im Gegensatz dazu zeigten Andersen et al. bei einer immunhistochemischen Studie von 99 superfiziell-spreitenden und 60 nodulären Primärmelanomen bei 77% der nodulären Melanome bzw. 44% der superfiziell-spreitenden Tumore eine zytoplasmatische S100A4-Verteilung. Des Weiteren wurde eine positive Korrelation zwischen der Höhe der S100A4-Proteinbiosynthese und der Tiefe der primären nodulären Melanom-Tumore festgestellt und eine hohe S100A4-Proteinbiosynthese korreliert mit einer kürzeren, krankheitsfreien Überlebenszeit für den Patienten. Hinzu kam die Beobachtung, dass die metastasierenden, nodulären Tumore tendenziell weniger S100A4-Protein aufwiesen und somit spekuliert wurde, dass S100A4 in den weniger fortgeschrittenen Läsionen zu erhöhter Aggressivität führt und dadurch das metastatische Potential des Tumors verstärkt wird [61].

Die verminderte S100A4-Expression in fortgeschrittenen Tumorstadien zeigte auch eine Untersuchung von 40 Melanom-Tumorproben, die im Vergleich zur normalen Haut eine signifikant erniedrigte S100A4-Transkriptmenge bei Tumoren im Stadium 4 sowie bei der Mehrheit der Melanome im Stadium 3 festgestellt hatte. Ebenso wurde eine signifikant höhere S100A4-Expression in der primären Melanomzelllinie im Vergleich zu den S100A4-Transkriptmengen in kultivierten Zellen eines sekundären Tumors bzw. einer Metastase gezeigt [175].

In anderen Studien wurde weder in Melanozyten noch in Melanomzellen signifikante Mengen an S100A4 nachgewiesen [176, 177].

RAGE

Abe und Kollegen wiesen RAGE sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in zwei humanen Melanomzelllinien (A375, G361) nach, wobei in normalen Melanozyten RAGE nur schwer zu detektieren war. Des Weiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass in Nacktmäusen mit subkutanen Melanomzellen-Xenografts die intraperitoneale Verabreichung von RAGE-Antikörpern zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums führt. Ebenso konnte bei tumortragenden Mäusen (intraperitoneale Melanomzellen-Xenografts) die Gabe von RAGE-Antikörpern die Überlebensrate der Mäuse verlängern und die spontane Lungenmetastasierung reduzieren [178].

Wiederum Leclerc et al. stellten die höchste Expression von RAGE-Transkripten in der primären Melanomzelllinie fest im Vergleich zur RAGE-Expression in Zelllinien aus einer Metastase bzw. eines Sekundärtumors, allerdings im Vergleich zur S100A4-Expression in weitaus geringeren Mengen. Die bereits erwähnte Analyse von 40 Tumorproben ergab eine signifikante RAGE-Überexpression bei Melanomen im Stadium 4 im Vergleich zu Tumoren im Stadium 3 [175].

Zusammenfassend betrachtet kann aus den bisherigen Untersuchungen noch keine eindeutige Aussage zur Rolle von S100A4 und RAGE beim malignen Melanom getroffen werden. Mit der vorliegenden Arbeit soll diese Bedeutung näher untersucht werden.

1.7 Zielstellung

In der Literatur ist die Beteiligung von S100A4 an Prozessen der Metastasierungskaskade bei einer Vielzahl von Tumorentitäten beschrieben. Zudem scheint S100A4, trotz zum Teil widersprüchlicher Aussagen, nicht nur ein einfacher Marker für Metastasierung zu sein, sondern vielmehr eine kausale Rolle bei der Vermittlung des Metastasierungsprozesses zu übernehmen. Die Aufklärung der biologischen Funktion und der molekularen Mechanismen, über die S100A4 das Metastasierungsgeschehen fördert, wird neue, wichtige Erkenntnisse über das Verhalten von Tumorzellen bringen. Diese Informationen können für den Einsatz von S100A4 als diagnostischer Marker und als Zielprotein für neue Therapien von Nutzen sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchungen das maligne Melanom gewählt, da es sich bei diesem Tumor um eine äußerst aggressive Form mit frühzeitiger Metastasenbildung und damit einhergehender hoher Therapie-Resistenz handelt. Des Weiteren exprimieren Melanome RAGE und S100A4 und die Stimulation von RAGE durch S100A4 scheint ein kritischer Faktor in der Tumorentwicklung, -progression und bei der Metastasierung zu sein.

Ausgehend von diesem Hintergrund wurde folgende Hypothese formuliert:

Das S100A4-Protein und dessen Interaktion mit dem Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (RAGE) sind bei Metastasierungsprozessen des malignen Melanoms von zentraler Bedeutung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die biochemische und radiopharmakologische Charakterisierung der S100A4-RAGE-Interaktion sowie die Untersuchung der Beteiligung von S100A4 an Prozessen der Metastasierungskaskade *in vitro* und *in vivo*. Dies erforderte die Herstellung von rekombinantem S100A4-Protein und die Generierung von stabil mit S100A4-transfizierten Melanomzellen, die damit eine heraufregulierte S100A4-Proteinbiosynthese aufweisen.

Daraus ergaben sich folgende konkrete Fragestellungen:

1. Wie hoch sind die mRNA-Expression und Proteinbiosynthese von S100A4 und RAGE bei Melanomzelllinien aus Primärtumoren und Metastasen?

2. Interagieren rekombinantes S100A4/¹⁸F-markiertes-S100A4 und RAGE sowohl *in vitro* als auch *in vivo* miteinander?
3. Werden bei Melanomzellen Metastasierungsprozesse wie Proliferation, Motilität, Adhäsion, Migration und Invasion durch die Heraufregulierung der S100A4-Proteinbiosynthese beeinflusst?
4. Wie wirkt sich die Heraufregulierung der S100A4-Proteinbiosynthese auf die Sekretion von S100A4 aus und welche Bedeutung hat das extrazelluläre S100A4-Protein bezüglich der Aktivierung von NF-κB und RAGE?
5. Beeinflusst die Heraufregulierung der S100A4-Proteinbiosynthese das Verhalten der Melanomzellen *in vivo*?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Geräte	Firma
ÄKTA™ basic 10	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
ÄKTAprime™ plus	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Aktivimeter Isomed 2000	Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Dresden
Analysenwaage LA 230 S	Sartorius AG, Göttingen
Biacore® T100	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Biolmaging System MF-ChemiBIS 3.2.	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Durchflussszytometer FACSAria™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Durchflussszytometer FACSCalibur™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Elektrophoresekammer Mini Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresekammer OWL B2	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG Perbio Science Deutschland, Bonn
Folienschweißgerät CR-320	Raypack, Stuttgart
Gamma-Radioaktivitätszähler COBRA™ II	Canberra-Packard GmbH, Dreieich
Gamma-Radioaktivitätszähler Wizard™ II	PerkinElmer, Rodgau
Geldokumentationssystem GeneFlash	Syngene, Cambridge (Großbritannien)
Gelelektrophorese-System Mini-PROTEAN® 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
horizontale Gelelektrophoresekammer Multiphor™ II	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Inkubator C200	Labotect GmbH, Göttingen
Inkubationsschüttler C24KC	New Brunswick, Edison (USA)
Kleintier-PET Scanner microPET P4	CTI Concorde Microsystems, Knoxville (USA)
KODAK In-vivo-Imaging System FX-Pro	Carestream Health Deutschland GmbH, Stuttgart
Magnetrührer mit Heizung MR3001K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach
MALDI Tandem-Massenspektrometer autoflex™ TOF/TOF	Bruker Daltonics, Bremen
Mastercycler® epgradient S realplex ²	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler® epgradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop AxioImager A1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop ECLIPSE TS100	Nikon GmbH, Düsseldorf

Material und Methoden

Mikrozentrifuge <i>5415 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg
pH Meter <i>713</i>	Metrohm AG, Herisau (Schweiz)
Photometer <i>Bio</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Photometer <i>Synergy 4</i>	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Präzisionswaage <i>CF 323 S</i>	Sartorius AG, Göttingen
Radioluminographie-Scanner <i>BAS 5000</i>	FUJIFILM Europe, Düsseldorf
Schüttelgerät <i>Polymax 1040</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Sterilbank <i>SterilGARD III Advance</i>	Baker Company, Sanford (USA)
Stromversorgungsgerät <i>PowerPac Basic</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Trans-Blot® Semi-Dry electrophoretic Transfer Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortex Schüttler <i>Genius 3</i>	IKA® Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Ultraschall-Homogenisator <i>Sonopuls HD 2200</i>	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Zellzählgerät <i>CASY® Model TT</i>	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Zentrifuge <i>5810 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien, die hier nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Eppendorf AG (Hamburg) und Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen) bezogen.

Materialien	Firma
0,2 ml <i>PCR Tubes Thermo-Strip</i> und <i>Flat Cap Strips</i>	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG Perbio Science Deutschland, Bonn
96-well Mikrotiterplatten <i>pureGrade™</i>	BRAND GmbH + Co.KG, Wertheim
96-Microwell™ Platten <i>MaxiSorp™</i>	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
<i>Cloning</i> -Zylinder (Höhe: 8 mm, Außen-Ø: 8 mm)	Hilgenberg GmbH, Malsfeld
CM5 Sensorchip <i>research grade</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Flüssig-Chromatographiesäule (für GST-Affinitätschromatographie)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Gel-Blotting-Papier (1,4 mm dick)	Whatman GmbH, Dassel
<i>HiTrap™ Desalting</i> Säule gepackt mit <i>Sephadex™ G-25 Superfine</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Kryoröhrchen (1,2 ml)	Biochrom AG, Berlin
Objektträger mit 8-Kammer-Polystyrol-Aufsatz (<i>chamber slide</i>)	BD Biosciences, Heidelberg

Polyacrylamid-Gradientengel <i>ExcelGel™ SDS, gradient 8-18</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Polystyrol Rundbodenröhrchen für FACS (5 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenfilter <i>Rotilabo®</i> , PVDF (0,22 µm, 0,45 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Superdex™ 75 10/300 GL (Gelfiltrationssäule)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Ultrafiltrationssäulen <i>Vivaspin 6</i> (MWCO 3 kDa, 10 kDa)	Sartorius, Göttingen
Western Blot-Membran <i>Westran® Clear Signal</i> , 0,45 µm PVDF	Whatman GmbH, Dassel
Zellsiebe <i>Fisherbrand</i> , 40 µm	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Zellkultureinsätze <i>ThinCerts™</i> , Porengröße 8 µm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), der Merck KGaA (Darmstadt) und der Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) bezogen. Es wurden stets Substanzen in höchster verfügbarer Reinheit verwendet. Chemikalien für molekularbiologische Methoden wurden in spezieller molekularbiologischer Qualität, d. h. RNase- und DNase-frei eingesetzt.

Chemikalie/Enzyme	Firma
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose <i>UltraPure™</i>	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Albumin Fraktion V (Rinderserumalbumin, BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Albumin Standard	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Benzonase®	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Calcein Acetoxymethylester (AM) <i>Fluorescent dye</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<i>Casy®ton</i> und <i>Casy®clean</i>	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Coomassie-Brilliantblau G-250	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Material und Methoden

Desoxyribonuklease I (DNase I), RNase-frei mit 10× Reaktionspuffer mit MgCl ₂ und 25 mmol/l EDTA	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fibronektin	Biochrom AG, Berlin
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
G418-BC Sulfat (Geneticindsulfat)	Biochrom AG, Berlin
L-Glutathion	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Glutathion-Agarose	Biontex Laboratories GmbH, Martinsried/Planegg
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Glycerol	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmen
HBS-EP+ (<i>Biacore</i> [®])	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
HEPES	Biochrom AG, Berlin
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	BDH über VWR International GmbH, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Leupeptin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Lipofectamine</i> [™] + <i>PLUS</i> [™] Reagenz	Invitrogen GmbH, Darmstadt
<i>Lipofectamine</i> [™] 2000	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Lysozym	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Magermilchpulver	J. M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG, Obergünzburg
<i>Matrigel</i> [™] Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, Phenol Red Free	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumacetat pH 5 (<i>Biacore</i> [®])	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Natriumdodecylsulfat/Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>O'GeneRuler</i> [™] DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (10×) pH 7,4 ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (PBS) für die Zellkultur	Biochrom AG, Berlin
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
<i>PreScission</i> [™] Protease	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Proteinstandard BSA 2 mg (für Proteinbestimmung)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Proteinstandard <i>Low-Range Rainbow Molecular Weight Marker (RPN755)</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Proteinstandard <i>Precision Plus Dual Color</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Restriktionsenzyme (BamH1, Pst1, Not1)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
T4 DNA Ligase mit 10× T4 DNA Ligase Reaktionspuffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

Material und Methoden

<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/μl) mit 10× <i>Taq Buffer advanced</i>	5 Prime GmbH, Hamburg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris (pH 10-11,5)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Trypsin (0,5%) / EDTA (0,2%) Lösung (10×) in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (10×)	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

2.1.4 Kits

Kit-Bezeichnung	Firma
<i>Amine Coupling Kit (Biacore)</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Fisher Scientific GmbH (Perbio Science/ Pierce), Schwerte
<i>Circlex™ S1004 ELISA Kit</i>	CycLex Co.,Ltd., Ina, Nagano (Japan)
<i>DNA Clean & Concentrator-25™-Kit</i>	Zymo Research Europe, Freiburg
<i>EndoFree® Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>FastPlasmid™ Mini Kit</i>	5 Prime GmbH, Hamburg
<i>GelElute Extraction Kit</i>	5 Prime GmbH, Hamburg
<i>NfκB-p65-Transkriptionsfaktor-Kit</i>	Fisher Scientific GmbH (Perbio Science/ Pierce), Schwerte
<i>miRNeasy Mini Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>Plasmid Midi Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR-Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>SuperScript® III One-Step RT-PCR Kit mit Platinum® Taq DNA Polymerase</i>	Invitrogen GmbH, Darmstadt
<i>TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing</i>	Invitrogen GmbH, Darmstadt
<i>Venor® GeM-Mykoplasmen-Detektionskit</i>	Minerva Biolabs GmbH, Berlin

2.1.5 Puffer, Medien und Lösungen

Die Herstellung sämtlicher Lösungen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit destilliertem Wasser als Lösungsmittel.

Puffer/Medium/Lösung	Zusammensetzung
6-facher Agarose-Ladepuffer	0,2% Xylencyanol (w/v) 0,2% Bromphenolblau (w/v) 50% Glycerin (v/v) 2 mmol/l EDTA
Bicarbonat-/Carbonatpuffer (pH 9,6)	100 ml 0,05 mol/l NaHCO ₃ (pH ~ 8,5) 30 ml 0,05 mol/l Na ₂ CO ₃ (pH ~ 11,4)
Blotpuffer (nach Bjerrum und Schäfer-Nielsen)	48 mmol/l Tris 39 mmol/l Glycin 20% Methanol (v/v) 0,004% SDS (w/v)
Coomassie-Färbelösung	50% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v) 0,1% Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (w/v)
Einfriermedium	10% DMSO (v/v) in FKS
Entfärbelösung 1 (für Coomassie-Färbung)	50% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)
Entfärbelösung 2 (für Coomassie-Färbung)	10% Methanol (v/v) 5% Essigsäure (v/v)
Extraktionspuffer (für Kernextraktion)	20 mmol/l HEPES (pH 7,9) 1,5 mmol/l MgCl ₂ 0,42 mol/l NaCl 0,2 mmol/l EDTA 25% Glycerin (v/v) frisch zugeben: 10 µg/ml Leupeptin 1 mmol/l PMSF 1 mmol/l DTT
reduziertes Glutathion (pH 8)	10 mmol/l reduziertes Glutathion 50 mmol/l Tris
GST-Bindungspuffer (pH 7,4)	PBS und frisch zugeben: 10 µg/ml Leupeptin 1 mmol/l PMSF 1 mmol/l DTT

Material und Methoden

GST-Spaltungspuffer Puffer (pH 7,5)	150 mmol/l NaCl
	50 mmol/l Tris-HCl
	1 mmol/l EDTA
	frisch zugeben: 1 mmol/l DTT
Kalzium-Bindungspuffer (pH 7,5)	150 mmol/l NaCl
	20 mmol/l HEPES
	1,2 mmol/l MgCl ₂
	1,3 mmol/l CaCl ₂
Kristallviolett-Lösung	0,5% Kristallviolett (w/v) in 20% Methanol (v/v)
LB-Medium	1% Pepton (w/v)
	0,5% NaCl (w/v)
	0,5% Hefe-Extrakt (w/v)
LB-Agar	2,5 g Agar
	150 ml LB-Medium
Lyse-Puffer (pH 6,8) (für Proteinextraktion)	50 mmol/l Tris-HCl
	2% SDS (w/v)
	frisch zugeben:
	1% TritonX-100
	10 µg/ml Leupeptin
	1 mmol/l PMSF
Lyse-Puffer (für Kernextraktion)	100 mmol/l HEPES (pH 7,9)
	100 mmol/l KCl
	15 mmol/l MgCl ₂
	frisch zugeben:
	10 µg/ml Leupeptin
	1 mmol/l PMSF
	1 mmol/l DTT
NaOH-SDS-Lösung	1% SDS (w/v) in 0,1 mol/l NaOH
PBS (pH 7,3)	140 mmol/l NaCl
	10 mmol/l Na ₂ HPO ₄
	2,7 mmol/l KCl
	1,8 mmol/l KH ₂ PO ₄
PBS-Tween	0,05% Tween 20 (v/v) in PBS
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 mol/l Tris-HCl
	200 mmol/l Glycin
	25 mmol/l Tris-HCl
SDS-Laufpuffer	0,1% SDS (w/v)

Material und Methoden

SDS-Probenpuffer	62,5 mmol/l Tris (pH 6,8) 8% Glycerin (v/v) 2% SDS (w/v) 1% β -Mercaptoethanol (v/v) 0,1% Bromphenolblau (w/v)
SOB-Medium (pH 6,7-7,0)	2% Pepton (w/v) 0,5% Hefe Extrakt (w/v) 20 mmol/l Glukose 10 mmol/l NaCl 10 mmol/l $MgCl_2$ 10 mmol/l $MgSO_4$ 2,5 mmol/l KCl
SOC-Medium (pH 7)	2% Pepton (w/v) 0,5% Hefe Extrakt (w/v) 20 mmol/l Glukose 10 mmol/l $MgCl_2$ 8,6 mmol/l NaCl 2,5 mmol/l KCl
<i>Stripping</i> -Puffer (pH 6,7)	50 mmol/l Tris 2% SDS (w/v) frisch zugeben: 0,07% β -Mercaptoethanol (v/v)
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (pH 8,5)	40 mmol/l Tris 0,1% Essigsäure (v/v) 2 mmol/l EDTA
TBS-Tween (pH 8,0)	150 mmol/l NaCl 10 mmol/l Tris 0,05% Tween 20 (v/v)
Transformationspuffer (TB-Puffer) (pH 6,7)	10 mmol/l PIPES 15 mmol/l $CaCl_2$ 250 mmol/l KCl nach Einstellung pH-Wert mit KOH: 55 mmol/l $MnCl_2$
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 mol/l Tris-HCl

2.1.6 Plasmide

Bezeichnung	Verwendung/Eigenschaft	Quelle
pCR [®] 4-TOPO [®]	Klonierungsvektor	Invitrogen, Darmstadt
pGEX-6P-1	prokaryotischer Expressionsvektor	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
hS100A4-pGEX-6P-1	Expression von humanem S100A4 als GST-Fusionsprotein	diese Arbeit

pIRES2-AcGFP1	eukaryotischer Expressionsvektor	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
hS100A4-pIRES2-AcGFP1	bicistronische Expression von humanem S100A4 und AcGFP1	diese Arbeit
mS100A4-pIRES2-AcGFP1	bicistronische Expression von murinem S100A4 und AcGFP1	diese Arbeit
hRAGE-pIRES-AcGFP1	bicistronische Expression von humanem RAGE und AcGFP1	[179]

2.1.7 DNA-Primer

Primer sind einzelsträngige Oligonukleotide, die über Wasserstoffbrückenbindungen komplementär an DNA binden. Sie erzeugen ein freies 3'-Ende, welches als Startsequenz für die DNA-Synthesereaktion dient und von der DNA-Polymerase in 5' → 3' Richtung verlängert werden kann.

Die Konstruktion der Primerpaare erfolgte mit Hilfe des Programms Primer 3 (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) unter Verwendung der mRNA-Sequenzen aus dem in **Tabelle 2-1** angegebenen NCBI-Gendatenbankeintrag (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabelle 2-1: NCBI-Gendatenbankeintrag der verwendeten Gene

Gen (Bezeichnung)	NCBI-Gendatenbankeintrag
human S100A4 (hS100A4)	NM_019554
maus S100A4 (mS100A4)	NM_011311
human RAGE (hRAGE)	NM_001136
maus RAGE (mRAGE)	NM_007425
human β -Aktin (h β -Aktin)	NM_001101
maus β -Aktin (m β -Aktin)	NM_007393

Die Primersequenzen für die quantitative Echtzeit-RT-PCR wurden so gewählt, dass mindestens einer der beiden Primer eine Exon-Intron-Grenze überspannt, damit die Amplifikation genomischer DNA aufgrund des längeren Intron-beinhaltenden Fragmentes erkannt wird. Weiterhin sollte die Produktlänge unter 250 bp liegen, um eine höchstmögliche Effizienz bei der PCR zu erreichen.

Die Synthese der DNA-Primer wurde von der Firma metabion GmbH (Martinsried) nach Vorgabe durchgeführt. In **Tabelle 2-2** sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt.

Tabelle 2-2: Sequenz, Position im Gen, Schmelztemperatur (T_m) und Produktlänge der verwendeten Primer

Bei den modifizierten Primern sind die Erkennungssequenzen der jeweiligen Restriktionsenzyme unterstrichen dargestellt.

Bezeichnung	Position im Gen	T _m (°C)	Produkt (bp)	Nukleotidsequenz 5'-3'
Primer zur Amplifikation der Kodierungsregion von hS100A4 und mS100A4				
hS100A4 forward	Exon 3	57	336	CTGACTGCTGTCATGGCGT
hS100A4 reverse	Exon 4			ACCACATCAGAGGAGTTTTTCAT
mS100A4 forward	Exon 1	60	441	TCAGCACTTCCTCTCTCTTGG
mS100A4 reverse	Exon 3			ACTCTGGCTTCTTCGCACAT
modifizierte Primer für die Klonierung von hS100A4 in den pGEX-6P-1-Vektor				
hS100A4-BamHI forward	Exon 3	61	356	GCCCTTGGATCCGCTGTC
hS100A4-NotI reverse	Exon 4			ACGAATGCGGCCGCACCA
modifizierte Primer für die Klonierung von hS100A4 und mS100A4 in den pIRES2-AcGFP1-Vektor				
hS100A4-PstI forward	Exon 3	52	334	CCTTCTGCAGGCTGTCAT
hS100A4-BamHI reverse	Exon 4			CATCAGAGGATCCTTCATTT
mS100A4-PstI forward	Exon 2	58	341	TGGTCTGCAGTCAACGGTTA
mS100A4-BamHI reverse	Exon 3			GAAGTGAAGGATCCTCAGAT
Primer für die mRNA-Nachweis und -Quantifizierung				
hS100A4 forward	Exon 3	60	209	GGTGTCCACCTTCCACAAGT
hS100A4 forward	Exon 4			TGCAGGACAGGAAGACACAG
mS100A4 forward	Exon 1	61	165	TCAGCACTTCCTCTCTCTTGG
mS100A4 reverse	Exon 2			AGCTCCCTGGTCAGTAGCTC
hRAGE forward	Exon 4/5	56	124	CCCAATAAGGTGGGGACA
hRAGE reverse	Exon 6			TCCTGGTCTGTTCTTCACA
mRAGE forward	Exon7/8	61	155	TCCACTGGATAAAGGATGGTG
mRAGE reverse	Exon 8			GACCCTGATGCTGACAGGAG
hβ-Aktin forward	Exon 4	60	233	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
hβ-Aktin reverse	Exon 5			AGCACTGTGTTGGCGTACAG
mβ-Aktin forward	Exon 4	63	211	ACCTTCAACACCCAGCCATG
mβ-Aktin reverse	Exon 4			GCTCGGTCAGGATCTTCATGAGG

h: human; m: maus

2.1.8 Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Bestellnummer und Firma
<i>primäre Antikörper</i>		
anti-S100A4 , polyklonal Kaninchen	1:500	A5114; Dako Deutschland GmbH, Hamburg
anti-RAGE (N-16), polyklonal Ziege	1:800	sc-8230; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
anti-β-Aktin , polyklonal Kaninchen	1:1.000	A5060; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>sekundäre Antikörper</i>		
Ziege anti-Kaninchen IgG- Peroxidase	1:10.000	A0545; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaninchen anti-Ziege IgG- Peroxidase	1:10.000	A5420; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

2.1.9 Zelllinien und Medien

Prokaryotische Zellen

Name	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> -Top 10	F– <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara</i> <i>leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Darmstadt
<i>E. coli</i> -DH5α™	F– Φ80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK–, mK+) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ– <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Invitrogen, Darmstadt
<i>E. coli</i> -BL21-Codon Plus(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F– <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (rB– mB–) <i>dcm+</i> Tetr <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Camr]	Agilent Technologies, Waldbronn

Die Kultivierung der transformierten *E. coli*-Bakterien erfolgte in LB-Selektionsmedium mit 50 µg/ml Ampicillin (pGEX-6P-1; pCR® 4-TOPO®) bzw. 50 µg/ml Kanamycin (pIRES2-AcGFP1).

Eukaryotische Zellen

Name	Ursprung	Bezugsquelle
A375	Mensch (weiblich), malignes Melanom der Haut	ATCC (CRL-1619)
A2058	Mensch (männlich, hellhäutig), malignes Melanom der Haut, Lymphknotenmetastase	ATCC (CRL-1147)
MEL-JUSO	Mensch (weiblich), malignes Melanom der Haut, Primärtumor	DSMZ (ACC 74)
B16-F10	Maus (Stamm C57BL/6J), Melanom der Haut	ATCC (CRL-6475)
THP-1	Mensch (männlich), akute monozytäre Leukämie	ATCC (TIB-202)
HAEC	Humane Endothelzellen aus der Aorta	Cascade Biologics (C-006-5C)

Die Kultivierung der Tumorzelllinien erfolgte in DMEM-Flüssigmedium ohne L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin), welchem 10% FKS und 1% *ZellShield*TM (< 0,1% Ciprofloxacin) hinzugefügt wurde. Zur Kultivierung der Endothelzellen (HAEC) wurde das *Endothelial Cell Growth Medium*-MV (PromoCell GmbH, Heidelberg) unter Zugabe des dafür vorgesehenen *Supplement Mix* (PromoCell GmbH, Heidelberg) verwendet.

Alle verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig mit dem *VenorGeM*[®]-*Mykoplasmen-Detektionskit* auf Mykoplasmen getestet. Dafür wurden die Zellen für 1-2 Wochen in Zellkulturmedium ohne Antibiotika kultiviert und passagiert. Für die Experimente wurden ausschließlich negativ getestete Zellen verwendet.

2.1.10 Versuchstiere

Die Haltung der Tiere und die Durchführung der Experimente erfolgten gemeinsam mit Prof. Dr. Jens Pietzsch, Dr. Ralf Bergmann und Dr. Birgit Mosch in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzbestimmungen und mit der Genehmigung und Kontrolle des zuständigen lokalen Tierversuch-Ethikkomitees.

Tierbezeichnung	Bezugsquelle
NMRI-nu/nu-Maus (Nacktmaus, weiblich, Alter: 7-9 Wochen)	Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden
Wistar-Ratte Unilever (Stamm: HsdCpb:WU, männlich, Alter: 7-9 Wochen, 180-230 g)	Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur selektiven Vervielfältigung von DNA unter Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen sowie zweier Startoligonukleotide (Primer), die zu je einem Abschnitt der DNA komplementär sind [180].

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden in 50 µl-Reaktionsansätzen unter den in **Tabelle 2-3** angegebenen Bedingungen im Mastercycler® *epgradient S* durchgeführt. Als DNA-Template wurden gereinigtes PCR-Produkt, Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente aus einer Gelextraktion verwendet.

Nach der PCR erfolgte die Reinigung des PCR-Produktes unter Verwendung des *GelElute Extraction Kit* nach Herstellerangaben und die Trennung der DNA in einem Agarosegel (vgl. 2.2.3). Bei Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragmentes einer Plasmid-DNA wurde der gesamte Reaktionsansatz in einem Agarosegel getrennt, das entsprechende Fragment ausgeschnitten und unter Verwendung des *GelElute Extraction Kit* nach Herstellerangaben extrahiert (vgl. 2.2.4).

Tabelle 2-3: Reaktionsansatz und PCR-Programm

Reaktionsansatz		Programm			
<i>Komponenten</i>	<i>Menge</i>		<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
10× <i>Taq Buffer</i>	5 µl	1. initiale Denaturierung:	95°C	4 min	} 25-30
Primer <i>forward</i> (10 µmol/l)	1 µl	2. Denaturierung:	95°C	30 s	
Primer <i>reverse</i> (10 µmol/l)	1 µl	3. Primeranlagerung:	spezifisch	30-45 s	
dNTPs (10 mmol/l)	2 µl	4. Elongation:	72°C	1 min	
<i>Taq Polymerase</i>	0,3 µl	5. finale Elongation:	72°C	5 min	
DNA(1-2 µg) + H ₂ O	41,7 µl	6. Kühlung:	4°C	∞	
	50 µl				

2.2.1.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der Reverse-Transkriptase(RT)-PCR wird mit dem Enzym Reverse Transkriptase aus der mRNA eines Organismus eine cDNA-Kopie hergestellt, die anschließend in einer PCR als Matrize dient und vervielfältigt wird.

Es wurde der *SuperScript® III One-Step RT-PCR Kit mit Platinum® Taq DNA Polymerase* und die aus Zellen isolierte RNA nach DNase-Behandlung (vgl. 2.2.11, 2.2.13) sowie der nachfolgend aufgeführte Reaktionsansatz und das angegebene RT-PCR-Programm verwendet (**Tabelle 2-4**).

Tabelle 2-4: Reaktionsansatz und Programm der RT-PCR

Reaktionsansatz		Programm		
Komponenten	Menge		Temperatur	Zeit
2× Reaktionsmix	10 µl	1. cDNA-Synthese:	55°C	30 min
Primer <i>forward</i> (10 µmol/l)	1 µl	2. Denaturierung:	95°C	5 min
Primer <i>reverse</i> (10 µmol/l)	1 µl	3. PCR:	40 Zyklen	
<i>SuperScript® III RT/</i>		Denaturierung	94°C	30 s
<i>Platinum® Taq Mix</i>	0,2 µl	Primeranlagerung	spezifisch	30 s
100 ng RNA + H ₂ O	7,8 µl	Elongation	72°C	1 min
	20 µl	4. finale Elongation:	72°C	5 min
		5. Kühlung:	4°C	∞

Im Anschluss an die RT-PCR wurden die amplifizierten Produkte in einem Agarosegel getrennt (vgl. 2.2.3).

2.2.1.2 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der Bakterien-Kolonien auf eine korrekte Plasmid-Insertion wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, in der das DNA-Insert (soweit vorhanden) amplifiziert wurde. Dazu wurden auf Selektiv-Agar gewachsene *E. coli*-Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze in einen vorbereiteten 20 µl-PCR-Ansatz suspendiert (**Tabelle 2-5**) und die Reaktion im PCR-Zykler gestartet. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Trennung der Amplifikate in einem Agarosegel (vgl. 2.2.3). Damit das Vorhandensein positiver *E. coli*-Kolonien zusätzlich mit einer Plasmidpräparation überprüft werden konnte, wurde die gleiche Pipettenspitze in einen mit LB-Selektionsmedium vorbereiteten Schüttelkolben überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Tabelle 2-5: Reaktionsansatz und Programm der Kolonie-PCR

Reaktionsansatz		Programm		
Komponenten	Menge	Temperatur	Zeit	Zyklen
10× Taq Buffer	2 µl			
Primer forward (10 µmol/l)	0,5 µl	1. initiale Denaturierung: 95°C	4 min	
Primer reverse (10 µmol/l)	0,5 µl	2. Denaturierung: 94°C	30 s	} ×25
dNTPs (10 mmol/l)	0,8 µl	3. Primeranlagerung: spezifisch	30 s	
Taq Polymerase	0,2 µl	4. Elongation: 72°C	1 min	
H ₂ O	7,8 µl	5. finale Elongation: 72°C	5 min	
	20 µl	6. Kühlung: 4°C	∞	

2.2.1.3 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Die fluoreszenzbasierte Echtzeit-RT-PCR ermöglicht die Quantifizierung von PCR-Produkten während der Amplifikation, da der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert und dadurch seine Fluoreszenz proportional zur gebildeten Amplifikatmenge zunimmt. Damit ist die relative Quantifizierung der Genexpression und damit der Vergleich von verschiedenen Proben möglich.

Mit dem *QuantiTect[®] SYBR[®] Green RT-PCR Kit* wurde die mRNA in einer Einschritt-Reaktion mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben und entsprechend der Angaben in **Tabelle 2-6** am *Mastercycler[®] epgradient S realplex²* durchgeführt. Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Amplifikate wurde von diesen Schmelzkurven erstellt. Dabei wurde nach erfolgreicher Produktamplifikation die Temperatur schrittweise auf 95°C angehoben und die Fluoreszenzintensität gemessen. Die PCR-Produkte denaturieren dabei entsprechend ihrer Größe und die Fluoreszenz nimmt in gleichem Maß ab, da der *SYBR Green* Farbstoff wieder frei wird.

Für jede zu untersuchende Probe wurde der Reaktionsansatz entsprechend der Angaben in **Tabelle 2-6** pipettiert. Als Negativkontrolle wurde für jedes Primerpaar anstelle der RNA 7,8 µl Wasser verwendet. Zur Überprüfung der korrekten Produktamplifikation wurden die Proben in einem Agarosegel getrennt (vgl. 2.2.3).

Tabelle 2-6: Reaktionsansatz und Programm der quantitativen Echtzeit-RT-PCR

Reaktionsansatz		Programm	
Komponenten	Menge	Temperatur	Zeit
2× <i>QuantiTect SYBR Green</i> <i>RT-PCR Master Mix</i> Primer <i>forward</i> (10 µmol/l) Primer <i>reverse</i> (10 µmol/l) <i>QuantiTect RT Mix</i> 100 ng RNA + H ₂ O	10 µl	1. cDNA-Synthese: 50°C	20 min
	1 µl	2. Denaturierung: 95°C	15 min
	1 µl	3. PCR: 40 Zyklen	
	0,2 µl	Denaturierung 94°C	15 s
	7,8 µl	Primeranlagerung spezifisch	20 s
	20 µl	Elongation 72°C	30 s
		55°C	15 s
		4. Schmelzpunktbest.: 55-95°C	in 20 min
		95°C	15 s
		5. Kühlung: 4°C	∞

Zur Normalisierung der Expression des Zielgens wurde als interne Kontrolle die Expression des Haushaltsgens β -Aktin zu Grunde gelegt. Ein solches Gen wird konstitutiv und unabhängig von den verschiedenen experimentellen Bedingungen exprimiert.

Die relative mRNA-Expression ergibt sich aus dem jeweiligen C_t -Wert (*threshold cycle*, Schwellenwertzyklus) des untersuchten Zielgens und dem des Haushaltsgens β -Aktin nach folgender Berechnung:

$$\text{relative mRNA-Expression} = 2^{-\Delta C_t}, \quad \Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Haushaltsgen}).$$

2.2.2 Enzymatische Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen der DNA und spalten doppelsträngige DNA, indem sie die Phosphodiesterbindungen in dieser Region hydrolysieren.

Die enzymatische Spaltung von DNA wurde mit zwei Restriktionsendonukleasen gleichzeitig durchgeführt, um als Ergebnis aus einem Vektor ein bestimmtes, von zwei Restriktionsschnittstellen eingerahmtes DNA-Fragment auszuschneiden. Es wurden Restriktionsenzyme (BamHI, NotI PstI) verwendet, die an der Schnittstelle überhängende Enden, sogenannte „*sticky ends*“ erzeugen. Laut Definition entspricht 1 *unit* der Enzymmenge, die 1 µg λ -Phagen-DNA pro Stunde bei 37°C vollständig schneidet. Die präparative Restriktionshydrolyse erfolgte in einem 30 µl-Reaktionsansatz entsprechend der Angaben in **Tabelle 2-7**.

Nach erfolgreicher Transformation eines Ligationsansatzes in *E. coli*-Bakterien und der

Überprüfung mittels Kolonie-PCR wurde von den *E. coli*-Kolonien mit dem korrekten DNA-Insert eine Plasmid-Mini-Präparation angeschlossen und eine Restriktionshydrolyse durchgeführt (Analytischer Reaktionsansatz, **Tabelle 2-7**).

Tabelle 2-7: Komponenten der enzymatischen Restriktionsspaltung

Komponenten	Präparativer Reaktionsansatz	Analytischer Reaktionsansatz
DNA	ca. 3-60 µg	ca. 1-10 µg
10× Puffer ¹	3 µl	2 µl
20% BSA	3 µl	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl	1 µl
Wasser <i>Mol Bio grade</i>	ad 30 µl	ad 20 µl
Volumen	30 µl	20 µl

Der Ansatz wurde zur Hydrolyse für 2-3 h (20 µl-Reaktionsansatz) bzw. 3-12 h bei 37°C inkubiert. Das Ergebnis der enzymatischen Spaltung wurde in einem Agarosegel überprüft (vgl. 2.2.3).

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Nukleinsäuren lassen sich im elektrischen Feld mit Hilfe der Gelelektrophorese nach ihrer Größe trennen.

Es wurde je nach Größe der zu trennenden DNA 0,8-2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen, in welcher das Gel bei Raumtemperatur auspolymerisieren konnte. Die Proben wurden mit 4 µl 6-fachem Agarose-Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und je nach Gelgröße bei 90-120 V für 30-60 min getrennt. Als Größenstandard wurden 4 µl des *O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (100 bp-10 kbp) mitgeführt. Anschließend wurde das Gel in einem Färbebad mit 0,0005% Ethidiumbromid (v/v) für 15-30 min gefärbt und mit dem UV-Transilluminator des Geldokumentationsgerätes dokumentiert.

2.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach der Elektrophorese wurde das zu isolierende DNA-Fragment unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des *GelElute Extraction Kit* nach

¹Es wurde jeweils der vom Hersteller empfohlene und mitgelieferte Puffer verwendet.

Herstellerangaben gereinigt. Zur Elution der DNA wurde das Produktpellet in 20 µl Wasser (*Mol Bio grade*, pH 8) resuspendiert. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde der Vorgang gegebenenfalls wiederholt. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.5 Ligation von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden unter Verwendung des *TOPO TA Cloning*[®] Kit nach Herstellerangaben in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor kloniert. Mit dieser Methode ist es möglich, in einem Schritt ein PCR-Produkt in einen Vektor zu klonieren und in *E. coli*-Zellen zu transformieren. Die *Taq*-DNA-Polymerase erzeugt T/A-Überhänge an den Enden der PCR-Produkte. Der pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor enthält die gleichen Überhänge und ist an das Enzym Topoisomerase 1 gekoppelt. Dieses Enzym ligiert das PCR-Produkt in den Vektor.

DNA-Fragmente, die mit der gleichen Restriktionsendonuklease geschnitten wurden, haben zueinander komplementäre Enden und können daher miteinander ligiert werden. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3-Hydroxylgruppe von doppelsträngiger DNA. So können DNA-Fragmente mit passenden Enden *in vitro* kovalent miteinander verknüpft werden.

Es wurden 1-3 µl Vektor-DNA mit 12-16 µl Insert-DNA eingesetzt und zusammen mit 0,2-0,5 µl T4 DNA-Ligase (200.000 U/ml, 1:5 verdünnt) und 2 µl 10-fachen T4 DNA-Ligase-Puffer in einem Endvolumen von 20 µl über Nacht bei 16°C (im PCR-Gerät) oder eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz direkt zur Transformation in *E. coli*-Bakterien eingesetzt (vgl. 2.2.10).

2.2.6 Klonierung des humanen S100A4-Gens in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-6P-1

Zur bakteriellen Expression von humanem S100A4 wurde das pGEX-6P-1-Vektorsystem verwendet, welches die Sequenz für einen N-Terminalen Glutathion-S-Transferase(GST)-Anhang enthält. Die kodierende cDNA-Sequenz für das humane S100A4-Gen wurde aus der RNA der humanen, akuten monozytären Leukämiezelllinie THP-1 unter Verwendung der entsprechenden Primer (vgl. **Tabelle 2-2**) mittels reverser Transkription und PCR (RT-PCR) amplifiziert (vgl. 2.2.11). Das gereinigte PCR-Produkt wurde in einer zweiten PCR-Reaktion (vgl. 2.2.1) mit der Primerkombination hS100A4-BamHI und hS100A4-NotI amplifiziert, so dass am 5'-

Ende der Sequenz eine BamHI- und am 3'-Ende eine NotI-Schnittstelle angefügt wurde. Das resultierende Amplikon wurde in den Klonierungsvektor pCR[®] 4-TOPO[®] kloniert (vgl. 2.2.5) und in *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert (vgl. 2.2.9). Der Erfolg der Ligation wurde mit einer Kolonie-PCR (vgl. 2.2.1.2) sowie durch Restriktionshydrolyse mit den Enzymen BamHI und NotI überprüft (vgl. 2.2.2). Die ausgeschnittenen Fragmente wurden aus dem Agarosegel isoliert (vgl. 2.2.4) und anschließend in den ebenfalls mit BamHI und NotI linearisierten Expressionsvektor pGEX-6P-1 ligiert (vgl. 2.2.5). Anschließend erfolgte die Transformation des Expressionskonstruktes in *E. coli*-TOP10-Zellen (vgl. 2.2.9). Die Klonierung in den korrekten Leserahmen hinter dem N-terminalen GST-Anhang des Vektors wurde durch Sequenzierung (LGC Genomics GmbH, Berlin) bestätigt und ist in **Abbildung 2-1** dargestellt.

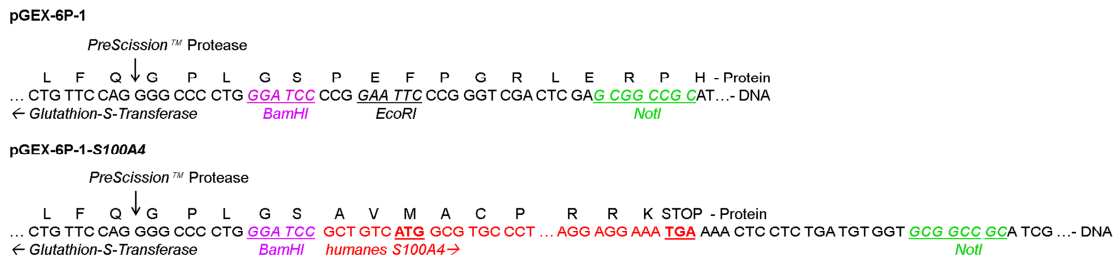


Abbildung 2-1: Klonierung des humanen S100A4-Gens in den pGEX-6P-1-Vektor

Dargestellt ist die multiple Klonierungsstelle des pGEX-6P-1-Vektors (oben) sowie Ausschnitte aus dem rekombinanten Vektor pGEX-6P-1-S100A4 (unten). Die Erkennungssequenz der PreScission[™] Protease ist mit einem Pfeil markiert. In der S100A4-DNA-Sequenz sind das Startcodon ATG sowie das Stopcodon TGA unterstrichen und fett markiert.

2.2.7 Klonierung des humanen und murinen S100A4-Gens in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1

Der pIRES2-AcGFP1-Vektor zeichnet sich durch eine sogenannte interne Bindungsstelle für Ribosomen (IRES: *internal ribosome entry site*) des Enzephalomyokarditis-Virus aus. Diese Sequenz erlaubt die Translation zweier offener Leserahmen von einer bicistronischen mRNA. Somit werden zwei unabhängige Gene, das interessierende Gen und das AcGFP1-Gen gemeinsam transkribiert, aber unabhängig voneinander translatiert. Bei AcGFP1 handelt es sich um ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea coerulescens*, das nach Translation im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist und bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 475 nm grünes Licht emittiert (Maximum bei 505 nm). Die Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette ermöglicht die Selektion in pro- und eukaryontischen Organismen. Aufgrund der Synthese des grün fluoreszierenden

Proteins kann sowohl die Transfektionseffizienz über Fluoreszenzmikroskopie (AcGFP1) bestimmt werden, als auch eine Selektion der fluoreszierenden Zellpopulation mittels Fluoreszenz aktivierter Zellsortierung (FACS) erfolgen.

Das gereinigte PCR-Produkt mit der kodierenden cDNA-Sequenz für das humane S100A4-Gen (vgl. 2.2.6) wurde in einer zweiten PCR-Reaktion mit der Primerkombination hS100A4-PstI und hS100A4-BamHI amplifiziert (vgl. 2.2.1), so dass am 5'-Ende der Sequenz eine PstI- und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle angefügt wurde.

Für die Klonierung des murinen S100A4-Gens wurde unter Verwendung der RNA der murinen Melanomzelllinie B16-F10 mit spezifischen DNA-Primern (vgl. **Tabelle 2-2**) die kodierende cDNA in einer reversen Transkription amplifiziert (vgl. 2.2.1.1). Das gereinigte PCR-Produkt wurde in einer zweiten PCR-Reaktion mit der Primerkombination mS100A4-PstI und mS100A4-BamHI (vgl. **Tabelle 2-2**) amplifiziert (vgl. 2.2.1), so dass am 5'-Ende der Sequenz eine PstI- und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle angefügt wurde.

Die resultierenden Amplifikate wurden in den Klonierungsvektor pCR[®]4-TOPO[®] kloniert (vgl. 2.2.5) und in *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert (vgl. 2.2.9). Der Erfolg der Ligation wurde mit einer Kolonie-PCR (vgl. 2.2.1.2) und durch Restriktionshydrolyse mit PstI und BamHI überprüft (vgl. 2.2.2). Die ausgeschnittenen Fragmente wurden aus dem Agarosegel isoliert (vgl. 2.2.4) und anschließend in den ebenfalls mit PstI und BamHI linearisierten Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1 ligiert (vgl. 2.2.5). Anschließend erfolgte die Transformation der Expressionskonstrukte in *E. coli*-DH5 α -Zellen (vgl. 2.2.9). Die Klonierung in den korrekten Leserahmen der Vektoren wurde durch Sequenzierung (LGC Genomics GmbH, Berlin) bestätigt und ist in **Abbildung 2-2** dargestellt.

pIRES2-AcGFP1
 NheI BglII XhoI EcoRI PstI SacI BamHI
 ...GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCGTCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCC...IRES

pIRES2-AcGFP1-hS100A4
 NheI BglII XhoI EcoRI PstI BamHI
 ...GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCGTCAGGCTGTCTATGGCGTGC...AAGAAATGAAGGATCC...IRES
 humanes S100A4 →

pIRES2-AcGFP1-mS100A4
 NheI BglII XhoI EcoRI PstI BamHI
 ...GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCGTCAGTCAACGGTTACCATGGCAAGA...AAGAAATGAAGGATCC...IRES
 murines S100A4 →

Abbildung 2-2: Klonierung des humanen und murinen S100A4-Gens in den pIRES2-AcGFP1-Vektor
 Dargestellt ist die multiple Klonierungsstelle des pIRES2-AcGFP1-Vektors (oben) sowie Ausschnitte aus den Polylinkern des pIRES2-AcGFP1-hS100A4- (Mitte) und pIRES2-AcGFP1-mS100A4-Vektors (unten). In den S100A4-DNA-Sequenzen sind das Startcodon ATG sowie das Stopcodon TGA unterstrichen und fett markiert.

2.2.8 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen (Top10, DH5 α , BL21-CodonPlus(DE3)-RIL) erfolgte nach der von Inoue und Kollegen etablierten Methode [181]. Dabei wurden 200 ml SOB-Medium mit einer *E. coli*-Vorkultur (40 ml) inokuliert, um eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 0,2 zu erreichen. Die Inkubation dieser Hauptkultur erfolgte unter Schütteln bei 20°C bis eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht wurde. Nachdem die Zellen 10 min auf Eis gekühlt wurden, fand die Zentrifugation der Zellen für 10 min bei $2.500 \times g$ und 4°C statt. Es folgte die Resuspendierung des Zellpelletts in 64 ml eiskalten TB-Puffer und nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut für 10 min bei $2.500 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Nach Aufnahme des Zellpellets in 15 ml eiskalten TB-Puffer erfolgte die tropfenweise Zugabe von 1.050 μ l DMSO (Endkonzentration: 7%) auf Eis. Daraufhin wurde die Zellsuspension aliquotiert (200 μ l), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.9 Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien

Unter Transformation versteht man das Einbringen von DNA in Bakterienzellen. Es wurden 100 μ l transformationskompetente *E. coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut und mit einem Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1 min. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien mit 900 μ l SOC-Medium versetzt und für 1-2 h bei 37°C im Schüttler (900 rpm) inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf den entsprechenden selektiven LB-Agarplatten mit Hilfe eines in Ethanol gelagerten und abgeflamten Drzygalski-Spatels ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Detektion positiver *E. coli*-Kolonien erfolgte mittels Kolonie-PCR (vgl. 2.2.1.2) bzw. mit Hilfe einer Restriktionshydrolyse (vgl. 2.2.2) der präparierten Plasmid-DNA.

2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen (40 ml) erfolgte unter Verwendung des *FastPlasmid™ Mini Kit* nach Herstellerangaben. Die gereinigte DNA wurde in 40 μ l Wasser (Mol Bio grade, pH 8) eluiert. Für die Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA wurden 100 ml Übernachtskulturen mit den entsprechenden plasmidkodierten Antibiotika unter Verwendung des *Plasmid Midi Kits* und des *Endofree® Plasmid Maxi Kit* nach Herstellerangaben präpariert.

2.2.11 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die RNA-Isolierung wurden 5×10^5 Zellen (A375, B16-F10) bzw. 1×10^6 Zellen (A2058, MEL-JUSO) mit 5 ml Zellkulturmedium in 25 cm² Zellkulturflaschen für 72 h kultiviert. Die Herstellung der Zellpellets erfolgte entsprechend der angegebenen Vorgehensweise (vgl. 2.6.2). Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die Isolierung der RNA aus den Zellen erfolgte mit dem *miRNeasy Mini Kit* nach Herstellerangaben. Die RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung wurde die RNA bzw. DNA 1:50 in Wasser (RNase-frei bzw. Mol Bio grade, pH 8) verdünnt und im Photometer durch Bestimmung der Extinktion bei 260 nm gegenüber einem Leerwert (Wasser) vermessen. Verunreinigungen der Probe können durch die Verhältnisbildung verschiedener Absorptionswerte erkannt werden. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm gibt die Verunreinigung der Nukleinsäure mit Proteinen wieder und sollte idealer Weise bei in Wasser gelöster, reiner RNA ca. 2,0 bzw. bei reiner DNA ca. 1,8 betragen. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 230 nm reflektiert Verunreinigungen durch z. B. Kohlenhydrate, Peptide, Phenole oder aromatische Verbindungen und sollte bei reinen Proben größer 2,0 sein.

2.2.13 DNase-Behandlung der isolierten RNA

Um RNA von Kontaminationen mit genomischer DNA zu reinigen, wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden 1 µg RNA, 1 µl 10-facher Reaktionspuffer sowie 1 µl DNase (1 U/µl) in einem Reaktionsvolumen von 10 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase erfolgte die Zugabe von 1 µl EDTA (25 mmol/l) und die Inkubation der Lösung für 10 min bei 65°C. Die RNA wurde bei -70°C eingefroren und kurz vor der Verwendung wurde erneut die Konzentration bestimmt (2.2.12).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Bakterielle Synthese des rekombinanten GST-S100A4 Fusionsproteins

Die transformierten *E. coli*-Bakterien BL21(pGEX-6P-1-S100A4) synthetisieren das Glutathion-S-Transferase(GST)-S100A4-Fusionsprotein nach Zugabe des Induktors Isopropionylthiogalactosidase (IPTG) in das Nährmedium.

Es wurden 400 ml LB-Selektionsmedium mit ca. 15 ml einer BL21(pGEX-6P-1-S100A4)-Vorkultur inokuliert, um eine Optische Dichte (OD_{600nm}) von 0,2 zu erreichen. Diese Hauptkultur wurde nun für 2-3 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,8-1,0 erfolgte die Zugabe von 1 mmol/l IPTG und die Bakterienkultur wurde für weitere 4 h bei 25°C unter Schütteln inkubiert.

2.3.2 Gewinnung des rekombinanten S100A4-Proteins aus Bakterien und dessen Reinigung mittels GST-Affinitätschromatographie

Die Bakterienkultur BL21(pGEX-6P-1-S100A4) wurde nach 4 h Inkubation bei 25°C geerntet und für 5 min bei $10.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Zellyse bei -70°C gelagert.

Das Zellpellet einer 400 ml Kultur wurde in 10 ml GST-Bindungspuffer resuspendiert und durch Zugabe von 1% TritonX-100 (v/v), 2 mg/ml Lysozym, sowie durch die Behandlung mit einem Ultraschall-Homogenisator (3×15 s, Amplitude: 50%) lysiert. Zur Verringerung der Viskosität wurden zum Lysat 2,5 U/ml Benzonase, eine Endonuklease, die DNA und RNA abbaut, hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation auf Eis unter Schütteln wurde das Zelllysate für 15 min bei $15.500 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Nachdem eine Säule mit 1 ml Glutathion-Agarose mit GST-Bindungspuffer equilibriert (3×1 Säulenvolumen) wurde, erfolgte die Zugabe des Zelllysate-Überstandes und die Inkubation für 30 min auf Eis unter Schütteln. Der Überstand wurde zweimal auf die Säule gegeben, um eine höchstmögliche Anbindung des GST-Fusionsproteins an die Glutathion-Agarose zu ermöglichen. Daraufhin wurde die Säule viermal mit je 5 ml GST-Bindungspuffer inklusive 0,25% TritonX-100 (v/v) und 1 mmol/l DTT gewaschen. Anschließend erfolgte die Equilibrierung der Säule durch zweimalige Zugabe von je 5 ml GST-Spaltungspuffer. Für die Abspaltung von S100A4 vom GST-Anhang wurden 40 µl (80 U/ml) *PreScission*TM Protease in 1 ml GST-Spaltungspuffer für 4 h auf der Säule bei 4°C inkubiert. Die Elution des S100A4-

Proteins erfolgte mit 7 ml GST-Spaltungspuffer (1×1 ml, 3×2 ml). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. 2.3.8) und unter Verwendung einer Ultrafiltrationsäule (3 kDa MWCO) durch Zentrifugation ($10.000 \times g$) konzentriert.

Die Glutathion-Agarose wurde mit reduziertem Glutathion von gebundenem Protein befreit (3×2 ml). Es folgte die Regeneration der Agarose mit 6 M Guanidinhydrochlorid (2×2 ml). Nach fünf Waschschritten mit PBS (je 1 Säulenvolumen) wurde die Säule zweimal mit 70%igem Ethanol (je 0,5 Säulenvolumen) und dreimal mit PBS (je 1 Säulenvolumen) gereinigt. Die Agarose wurde in 20% Ethanol gelagert.

2.3.3 Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie

Aufgrund der noch vorhandenen Verunreinigungen nach der GST-Affinitätschromatographie wurde als zweiter Reinigungsschritt eine Größenausschlusschromatographie angeschlossen. Dabei werden die gelösten Substanzen eines Proteingemisches nach Größe bzw. molekularer Masse getrennt. Größere Moleküle durchlaufen schneller die Matrix als kleinere Moleküle, denn diese dringen in die Poren der Gelmatrix ein und werden somit später eluiert.

Es wurde eine *SuperdexTM 75 10/300 GL*-Säule (24 ml Bettvolumen) mit dem Chromatographiesystem *ÄktaTM basic 10* verwendet. Mit dieser Säule wird eine gute Trennung zwischen 3 und 70 kDa erzielt. Alle Reinigungsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Equilibrierung der Säule mit 2 Säulenvolumen (48 ml) PBS wurde 1 ml des konzentrierten, sterilfiltrierten Proteingemisches (vgl. 2.3.2) injiziert. Die Probe wurde mit einer Flussrate von 0,5-0,8 ml/min durch die Säule geleitet und Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen. Mit einem UV-Detektor bei 280 nm am Gerät konnte während der Elution die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen bestimmt werden. Die Reinigung der *SuperdexTM 75*-Säule erfolgte mit 1,5 Säulenvolumina 20%igem Ethanol.

Die Fraktionen mit rekombinantem S100A4 wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem *BCA-Protein-Assay-Kit* nach Herstellerangaben und die Analyse der Proben mittels SDS-Gelelektrophorese (vgl. 2.3.8). Der Reinheitsgrad des rekombinanten S100A4-Proteins wurde unter Verwendung der AIDA-Software (raytest GmbH, Straubenhardt) densitometrisch bestimmt.

2.3.4 Gewinnung und Reinigung von rekombinantem sRAGE

Die Gewinnung von rekombinantem löslichem sRAGE aus Zellkulturüberständen eukaryotischer Zellen und die nachfolgende Reinigung mittels Nickel-Sepharose wurden in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Susan Hoppmann erarbeitet und sind in ihrer Dissertation [152] beschrieben und veröffentlicht [179]. Der Expressionsvektor pSecTag2B-sRAGE wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Bachmann (Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden) zur Verfügung gestellt.

Es wurden die stabil mit pSecTag2B-sRAGE transfizierten COS-7 Zellen verwendet, welche sRAGE als His-Fusionsprotein synthetisieren und in das Zellkulturmedium abgeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 3 Tage in 1% FKS um den Gehalt an Fremdprotein (v.a. Albumin), der bei der nachfolgenden Reinigung stören würde, so gering wie möglich zu halten. Alle Schritte der Proteinreinigung wurden auf Eis durchgeführt. Dafür wurden 100 ml sterilfiltriertes Zellkulturmedium mit rekombinantem sRAGE auf eine Säule mit 500 µl Ni²⁺-Sepharose™ 6 *Fast Flow* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) gegeben, welche zuvor mit His-Bindungspuffer (500 mmol/l NaCl, 20 mmol/l NaH₂PO₄, 5 mmol/l Imidazol, pH 8, frisch zugegeben: 10 µg/ml Leupeptin, 1 mmol/l PMSF) equilibriert wurde. Das Kulturmedium wurde zweimal auf die Säule gegeben, um eine höchstmögliche Anbindung von sRAGE-(His)6-Proteinen an die Ni²⁺-Sepharose zu ermöglichen. Anschließend wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina eiskaltem His-Bindungspuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu eliminieren. Es folgte die Elution von rekombinantem sRAGE mit 8 ml (4 × 2 ml) His-Elutionsuffer (500 mmol/l NaCl, 20 mmol/l NaH₂PO₄, 250 mmol/l Imidazol, pH 8, frisch zugegeben: 10 µg/ml Leupeptin, 1 mmol/l PMSF). Für die Reinigung der Säule wurde zunächst destilliertes Wasser (2-5 ml) und anschließend 20% Ethanol (2-5 ml) verwendet. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (vgl. 2.3.7) analysiert, unter Verwendung einer Ultrafiltrationsäule (10 kDa MWCO) durch Zentrifugation (10.000 × g) konzentriert und dabei in PBS überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *BCA-Protein-Assay-Kit*.

2.3.5 Proteinextraktion

Es wurden 5 × 10⁵ Zellen (A375, B16-F10) bzw. 1 × 10⁶ Zellen (A2058, MEL-JUSO) in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und für 72 h kultiviert. Die Herstellung der Zellpellets erfolgte entsprechend der angegebenen Vorgehensweise (vgl. 2.6.2). Diese wurden entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Zelllyse bei -70°C

gelagert oder sofort lysiert. Zur Proteinextraktion wurde das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Behandlung mit einem Ultraschall-Homogenisator (15 s, Amplitude: 20%) und die Zentrifugation für 15 min bei $20.000 \times g$ (Zentrifuge 5810 R) und 4°C . Der Überstand wurde entnommen, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *BCA-Protein-Assay-Kit* nach Herstellerangaben, wobei BSA als Standardlösung verwendet wurde.

2.3.6 Extraktion von Zellkernproteinen

Die Untersuchung der Wirkung von extrazellulärem S100A4 auf die Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors in den A375-hS100A4-Zellen und nicht-transfizierten A375-Zellen (vgl. 2.6.12) erforderte die Präparation von Zellkernextrakten. Dafür wurden 5×10^5 Zellen als Doppelbestimmung in 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät und für 72 h kultiviert. Daraufhin wurde das Zellkulturmedium der A375-hS100A4-Zellen entnommen, für 5 min bei $500 \times g$ zentrifugiert und zu den A375-Zellen gegeben. Zum Vergleich wurden die A375- und A375-hS100A4-Zellen in normalem Kulturmedium mitgeführt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C kultiviert. Anschließend erfolgte die Herstellung der Zellpellets entsprechend der angegebenen Vorgehensweise (vgl. 2.6.2). Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Extraktion der Zellkernproteine bei -70°C aufbewahrt.

Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 5 min, $200 \times g$, 4°C). Daraufhin wurden die Zellen in je 150 μl Lysepuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Lyse der Zellmembran wurden je 7,5 μl Igepal CA 630 hinzugegeben und die Zellsuspensionen wurden für 10 s auf einem Vortex-Schüttler gut durchmischt. Danach wurden die Suspensionen für 3 min bei $16.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die Überstände, die die Zytosolfractionen enthielten, wurden in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben und bei -20°C aufbewahrt. Nach Waschen der Zellpellets mit je 150 μl Lysepuffer (Zentrifugation: 3 min bei $16.000 \times g$, 4°C) erfolgte die Zugabe von 50 μl Extraktionspuffer. Zum Homogenisieren wurden die einzelnen Lösungen zehnmal mit einer Kanüle ($0,45 \times 12 \text{ mm}$) an einer 1 ml Einmal-Spritze aufgezogen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zelllysate für 30 min bei 4°C unter Schütteln (Thermomixer: 500 rpm) und die Zentrifugation für 15 min bei $16.000 \times g$ und 4°C . Der Überstand wurde entnommen und bis zur Verwendung für den *NF κ B-Transkriptionsfaktor-p65-Kit* bei -70°C gelagert. Die Bestimmung der

Proteinkonzentration erfolgte mit dem *BCA-Protein-Assay-Kit* nach Herstellerangaben, wobei BSA (400 µg/ml) als Standardlösung verwendet wurde.

2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zum Nachweis von Proteinen werden diese in einem Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch nach ihrer Molmasse getrennt. Das SDS sorgt dabei sowohl für Denaturierung (besonders nach vorheriger Reduktion mit β-Mercaptoethanol) als auch für eine gleichmäßige negative Ladung der Proteine, welche als SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol wandern. In den engen Maschen der Polyacrylamidmatrix wandern kleine Proteinmoleküle schneller, während die größeren eher zurückbleiben, wodurch es zu klar voneinander abgegrenzten Proteinbanden kommt. Es wurde ein diskontinuierliches System mit Tris-Glycin Puffern nach Lämmli [182] verwendet.

Für die Trennung von Proteinen zwischen 30 kDa und 120 kDa wurde ein Trenngel mit einer Acrylamidkonzentration von 10% gewählt (RAGE: 46 kDa, β-Aktin: 42 kDa). Ein 15%iges Trenngel wurde für den Nachweis von Proteinen zwischen 10 und 60 kDa (S100A4: 12 kDa) verwendet. Das Sammelgel wies eine Acrylamidkonzentration von 4% auf (**Tabelle 2-8**).

Tabelle 2-8: Zusammensetzung von zwei SDS-Polyacrylamid-Gelen (8 cm x 7,3 cm)

	Sammelgel	Trenngel	
Acrylamidkonzentration [%]	4	10	15
Aqua dest. [µl]	2900	2730	1060
30% Acrylamid [µl]	530	3330	5000
Trenngelpuffer [µl]	-	3750	3750
Sammelgelpuffer [µl]	500	-	-
10% SDS [µl]	40	100	100
10% APS [µl]	20	80	80
TEMED [µl]	4	8	8

Für den Proteinnachweis wurden 50 µg Gesamtprotein des jeweiligen Zelllysates mit 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 99°C denaturiert. Anschließend wurde die Elektrophorese mit SDS-Laufpuffer bei 120-140 V durchgeführt. Zur Bestimmung der molekularen Masse der Proteine wurde das gefärbte Proteingemisch *Precision Plus Protein Standard Dual Color* (10-250 kDa)

verwendet. Die Färbung der Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel erfolgte für ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung. Coomassie-Brilliant-Blau lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt damit unspezifisch Proteine im Gel an. Anschließend wurden die Gele durch Inkubation in Entfärbelösung 1 für einige Minuten und Entfärbelösung 2 bis zur gewünschten Intensität der Proteinbanden entfärbt.

2.3.8 Western-Blot und Proteinnachweis

Beim Western Blot wurden die im SDS-Polyacrylamid-Gel (2.3.7) getrennten Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (0,45 µm) übertragen, um nachfolgend spezifisch durch Antikörper detektiert werden zu können. Dabei wurde das *Semi-dry-Blot*-Verfahren angewendet, bei dem zwei in Blotpuffer getränkte Filterpapiere auf die Anoden-Platte der Blot-Apparatur gelegt wurden, gefolgt von einer mit 100% Methanol und Blotpuffer äquilibrierten PVDF-Membran und dem SDS-Polyacrylamid-Gel. Abschließend wurden zwei weitere in Blotpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt und vorhandene Luftblasen wurden entfernt, bevor die Kathodenplatte aufgesetzt wurde. Der elektrophoretische Transfer erfolgte in einer *TransBlot® Semi-dry*-Apparatur bei 10 V für 90 min.

Zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde die Membran mit den transferierten Proteinen für mindestens 60 min bei Raumtemperatur in Blockierungslösung geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Es folgte dreimaliges Waschen mit TBS-Tween für je 10 min unter Schütteln und die Inkubation mit dem Peroxidase(POD)-gekoppelten Sekundärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur unter Schwenken. Alle Antikörper wurden in Blockierungslösung verdünnt. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper sind in Abschnitt 2.1.8. aufgeführt. Nach mehrmaligem Waschen in TBS-Tween für 1-2 h unter Schwenken erfolgte die Detektion der spezifischen Antikörperbindung durch Verwendung des *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (jeweils 500 µl von Luminol/Enhancer Solution und Peroxide Solution). Dabei spaltet die auf der Membran gebundene Peroxidase das zugegebene Substrat Luminol, wodurch es zur Chemilumineszenz kommt, welche mit einem *Biolmaging-system* in einem digitalen Bild festgehalten wurde. Für den Nachweis des RAGE-Antikörpers auf der Membran war zusätzlich die Zugabe von *SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (jeweils 30 µl von Luminol/Enhancer Solution und Peroxide Solution) bzw. *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* (jeweils

50-100 µl von Luminol/*Enhancer Solution* und *Peroxide Solution*) notwendig. Aufgrund der hohen Sensitivität dieser Substrate ist es möglich, schwache Signale zu verstärken. Im zweiten Schritt wurde bei allen Western Blots als Ladekontrolle β -Aktin auf der Membran nachgewiesen. Dafür wurde die Membran zunächst dreimal in TBS-Tween gewaschen und dann für ca. 7 min mit *Stripping*-Puffer bei 55°C drehend in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden dadurch denaturiert und abgelöst. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Tween und erneuter Inkubation mit Blockierungslösung für 60 min unter Schwenken konnte die Membran für einen weiteren Proteinnachweis verwendet werden. Andernfalls wurde gleichzeitig ein zweites SDS-Polyacrylamid-Gel (vgl. 2.3.7) und anschließend Western Blot für den Nachweis von β -Aktin verwendet. Die semiquantitative Auswertung der Proteinbiosynthese erfolgte mit der Software TotalLab TL100 1D v2008.01 (Biostep GmbH, Jahnsdorf). Von jeder Proteinbande wurde die Grundfläche der Bande sowie die Intensität der Graustufe abzüglich des Hintergrundsignals berechnet. Die ermittelten Werte aus den Proteinbanden des Zielproteins wurden mit den Werten der dazugehörigen Banden der Ladungskontrolle β -Aktin ins Verhältnis gesetzt.

2.4 Biophysikalische Methoden

2.4.1 Massenspektrometrie

Die Identifizierung von rekombinantem S100A4 erfolgte mit einem MALDI Tandem-Massenspektrometer *autoflex™ TOF/TOF*. Zur Verwendung als Matrix wurden 40 mg/ml 3,5-Dimethoxy-4-hydroxysäure (Sinapinsäure) in 33% (v/v) Acetonitril und 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure gelöst. Die Proben wurden nach dem Sandwich-Verfahren (1 µl Sinapinsäure + 1 µl Probe + 1 µl Sinapinsäure) auf einen Spot eines Edelstahl-Targets (MTP 384, Bruker Daltonics, Bremen) gegeben und an der Luft getrocknet. Die mittlere, molekulare Masse (m/z) der Proteine wurde aus mehreren unabhängigen Messungen ermittelt.

2.4.2 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

Mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie (SPR) lassen sich Interaktionen von Biomolekülen an einer Sensorchipoberfläche in Echtzeit analysieren sowie deren kinetische Konstanten bestimmen.

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen S100A4 und RAGE wurden SPR-Messungen am *Biacore® T100* von Jens Lenk im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt. Als Ligand wurden 4300-6100 *response units* (RU) an rekombinantem sRAGE (20 µg/ml in 10 mmol/l Natrium-Acetat, pH 5) auf einem CM5-Sensorchip (carboxymethylierte Dextranmatrixoberfläche) unter Verwendung des *Amine Coupling Kits* bei 25°C mit einer Flussrate von 10 µl/min und einer Kontaktzeit von 500 s immobilisiert. Die Affinitätsmessungen erfolgten in HBS-EP+-Puffer (10 mmol/l HEPES, 150 mmol/l NaCl, 3 mmol/l EDTA, 0,05% Surfactant P20, pH 7,4) der Firma GE Healthcare Europe GmbH. Zur Bestimmung der kinetischen Bindungsparameter wurden verschiedene Konzentrationen von S100A4 (2,5-20 µmol/l) bei 25°C mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 µl/min und einer Injektionszeit von 120 s über den Sensorchip geleitet. Nach jeder Messung wurde das gebundene S100A4 auf der Sensoroberfläche durch Injektion von 3 mol/l NaCl für 30 s entfernt. Für die Auswertung der Daten und die Berechnung der Dissoziationskonstante (K_D) wurde die *Biacore® T100* Evaluierungssoftware 2.0.1 verwendet. Die erhaltenen Signalintensitäten RU (Resonanzeinheiten) nach Zugabe der verschiedenen S100A4-Konzentrationen wurden in Abhängigkeit von der Zeit als Sensorgramme dargestellt und iterativ angepasst. Dabei ist die Signalstärke proportional zur gebundenen Masse an der Chipoberfläche und wird in Resonanzeinheiten (RU) ausgedrückt, wobei 1 RU einer Masse von 1 pg/mm² entspricht.

2.5 Radiochemische und Radiopharmakologische Methoden

2.5.1 Synthese von *N*-Succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorbenzoat

N-Succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB) wurde in einem modifizierten Modul TRACERlab Fx_{FDG} der Firma GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg) unter Verwendung des Computerprogrammes Tracerlab Fx hergestellt. Die Synthese erfolgte entsprechend der Vorgehensweise nach Mäding et al. [183].

2.5.2 Radiomarkierung von S100A4

Die Radiomarkierung von S100 Proteinen wurde in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Susan Hoppmann erarbeitet und sind in ihrer Dissertation beschrieben [152] bzw. veröffentlicht [184].

Für die Radiomarkierung von humanem S100A4 mit [^{18}F]SFB wurden 300 μl S100A4-Protein (2,3-2,6 mg/ml) in PBS pH 7,3 eingesetzt und zur Erzielung einer höheren Markierungsausbeute wurden zur pH-Wert-Erhöhung 150 μl PBS pH 8,2 hinzugefügt. Die Markierungsreaktion erfolgte nach Zugabe von ca. 100 μl in Acetonitril gelöstem [^{18}F]SFB (800-1.000 MBq) bei Raumtemperatur für 30 min und unter stetigem Schütteln im Thermomixer (300 rpm). Das entstandene ^{18}F -Fluorbenzoyl-S100A4 (^{18}F -S100A4) wurde durch Größenausschlusschromatographie von radioaktiven niedermolekularen Verbindungen, wie z. B. nicht umgesetztem [^{18}F]SFB bzw. Nebenprodukten, wie z. B. [^{18}F]Fluorbenzoat getrennt. Dazu wurde eine *HiTrap Desalting*-Säule an das Chromatographiesystem ÄKTApriTM plus angeschlossen und mit Kalzium-Bindungspuffer equilibriert. Anschließend wurden 500 μl ^{18}F -S100A4 injiziert und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min durch die Säule geleitet. Mit einem UV-Detektor am Gerät wurde während der Elution die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen bei 280 nm detektiert. Es wurden Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen und deren Aktivität am Aktivimeter ISOMED 2000 bestimmt. Die Fraktionen mit gereinigtem ^{18}F -S100A4 wurden vereinigt (Präparat) und für weitere Untersuchungen verwendet.

2.5.3 Radio-SDS-PAGE von ^{18}F -S100A4

Die Radio-SDS-Gelelektrophorese wurde zur Bewertung des Reinigungsprozesses und zur Analyse von Blutproben eingesetzt. Die Trennung erfolgte mit Hilfe von Fertiggelen (8-18%) in einer horizontalen Gelkammer. Die Detektion und Auswertung der Proteinbanden erfolgte mittels Radioluminographie (BAS-Reader) und der *Advanced Image Data Analyzer software* (AIDA) Version 4.14. der Firma Raytest (Straubenhardt). Die Aktivitätsintensitäten der Proteinbanden wurden als Prozent der Gesamtaktivität ausgedrückt.

2.5.4 sRAGE-Bindungsassay

Für Untersuchungen zur Bindung von ^{18}F -S100A4 an immobilisiertem sRAGE *in vitro* wurde der sRAGE-Bindungsassay durchgeführt, welcher in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Susan Hoppmann erarbeitet, in ihrer Dissertation [152] beschrieben und veröffentlicht [179] wurde.

Es wurde eine 96-MicrowellTM Platte MaxiSorpTM mit 2,5 μg rekombinantem sRAGE, 2,5 μg BSA in Bicarbonat-/Carbonatpuffer bzw. nur Bicarbonat-/Carbonatpuffer (100 μl pro well) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Lösungen

abgenommen, dreimal mit PBS-Tween (250 µl pro well) gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 2 h mit 2% BSA (v/w) in PBS (100 µl pro well) inkubiert. Danach wurde das ^{18}F -S100A4-Präparat (330-400 kBq; 1-2 µg pro well) in 2% BSA (v/w) in Kalzium-Bindungspuffer (100 µl pro well) hinzugegeben und für 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS-Tween (250 µl pro well) auf Eis wurde das gebundene ^{18}F -S100A4-Protein durch Zugabe von NaOH-SDS-Lösung extrahiert. Für die sich anschließende Aktivitätsmessung wurde die komplette Zellsuspension in ein Messröhrchen gegeben und im Gamma-Radioaktivitätszähler *COBRA™ II* gemessen.

2.5.5 Zellassoziationsversuche mit ^{18}F -S100A4

Die zelluläre Assoziation von ^{18}F -S100A4 wurde an Endothelzellen (HAEC) und an A375-Melanomzellen untersucht. Die Endothelzellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten für 48 h (5×10^3 Zellen pro well) bzw. 24 h (1×10^4 Zellen pro well) in 250 µl Kulturmedium kultiviert (je nachdem wieviel Zeit bis zum Versuchstag zur Verfügung stand). Für Blockierungsversuche wurden die Zellen vor der Zugabe des ^{18}F -S100A4-Präparates mit 10 µl nicht-radioaktivem S100A4 (2,4 mg/ml in PBS) bzw. 10 µl PBS pro Kavität inkubiert.

Die Aussaat der A375-Zellen erfolgte ebenfalls in 96-well-Mikrotiterplatten für 48 h (1×10^4 Zellen pro well) bzw. 24 h ($1,5 \times 10^4$ Zellen pro well) in 250 µl Kulturmedium. Nach Entfernung des Mediums wurde das ^{18}F -S100A4-Präparat (100-200 kBq, 0,5-1 µg) in 100 µl PBS pro well zu den Zellen gegeben und für 1 h bei 37°C bzw. 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sofort auf Eis gelagert, das Medium vollständig abgenommen und dreimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen (250 µl pro Kavität). Zur Lyse der Zellen wurde 250 µl NaOH-SDS-Lösung pro well auf die Platte gegeben und unter Schütteln 30 min einwirken lassen. Für die sich anschließende Aktivitätsmessung wurde die komplette, gut durchmischte Zellsuspension in ein Messröhrchen gegeben und im Gamma-Radioaktivitätszähler *COBRA™ II* gemessen. Bei der Auswertung wurde die gemessene Aktivität auf 250 µl Gesamtzellsuspension berechnet. Zur Bestimmung der zu jeder Kavität gegebenen Gesamtaktivität wurden 10 µl des ^{18}F -S100A4-Präparates in PBS mit 240 µl NaOH-SDS-Lösung gemessen (Sechsfachbestimmung). Am nächsten Tag wurde der Proteingehalt von jeder Kavität mit dem *BCA-Protein-Assay-Kit* nach Herstellerangaben bestimmt, wobei 400 µg/ml BSA als Standardlösung verwendet wurde. Die Proteinkonzentration wurde auf 250 µl Gesamtzellsuspension berechnet und für jede Kavität in mg angegeben.

Die zelluläre Assoziation des ^{18}F -S100A4-Präparates ist in Prozent zur gegebenen Gesamtaktivität pro mg Protein dargestellt (%ID/mg Protein).

2.5.6 *In vivo*-Stabilität von ^{18}F -S100A4

Zur Untersuchung der metabolischen Stabilität von ^{18}F -S100A4 wurde zunächst eine Wistar-Ratte durch die Inhalation von 9% (v/v) Desfluran in einem Luft-Sauerstoff-Gemisch aus 600 ml/min Luft und 400 ml/min Sauerstoff bei einem Gasfluss von 1000ml/min in Narkose versetzt. Für die Entnahme arterieller Blutproben wurde ein Katheter in die rechte Halsschlagader platziert. Es wurden ca. 5 MBq ^{18}F -S100A4 in PBS in einem Volumen von 1 ml in die Schwanzvene injiziert. Nach 10, 30 und 60 min wurden arterielle Blutproben entnommen (jeweils ca. 100 μl) und direkt nach der Entnahme zentrifugiert (5 min bei $10.000 \times g$). Das entnommene Blutvolumen wurde durch Injektion von isotonischer Kochsalzlösung ersetzt. Die arteriellen Blutproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für ca. 15 min bei 105°C gekocht und mittels Radio-SDS-PAGE (vgl. 2.5.3) analysiert.

2.5.7 Bioverteilungsuntersuchungen von ^{18}F -S100A4

Die Verteilung von ^{18}F -S100A4 wurde in männlichen Wistar-Ratten 5 und 60 min nach intravenöser Injektion in die Schwanzvene untersucht. Für die zwei Zeitpunkte wurden jeweils vier Tiere mit Desfluran narkotisiert (vgl. 2.5.6) und jedem Tier 500 μl ^{18}F -S100A4 (1,2-1,5 MBq) injiziert. Nach der Verteilungszeit wurden die Versuchstiere erneut mit Desfluran anästhesiert und nach Entnahme der Blutproben durch Herzpunktion getötet. Die Organe und Gewebe wurden entnommen, gewogen und die ^{18}F -Aktivität wurde in einem Gamma-Radioaktivitätszähler *WizardTM* gemessen. Die Konzentration ^{18}F -markierter Substanzen wurde als Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) dargestellt. Die Aktivitätsmenge im Urin wurde aus der gesamten injizierten Aktivität minus der Summe der Aktivitätsmengen in den einzelnen Organen und dem Resttier berechnet.

2.5.8 Positronen-Emissions-Tomographie mit ^{18}F -S100A4

Der zeitliche Verlauf der Aktivitätsverteilung von ^{18}F -S100A4 im lebenden Versuchstier (Wistar-Ratten) wurde mit dem Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographen *microPET P4* (örtliche Auflösung: 1,8-2,3 mm) untersucht.

In die Schwanzvene von Wistar-Ratten (n = 6) unter Desfluran-Narkose (vgl. 2.5.6)

wurden 500 μl ^{18}F -S100A4 (10-20 MBq) innerhalb von 30 s mit bzw. ohne 2 $\mu\text{mol/l}$ humanem glykiertem *Low-Density*-Lipoprotein (glykLDL) injiziert und zur gleichen Zeit wurde die dynamische PET-Untersuchung mit einer Aufnahmedauer von 120 min gestartet. Dabei wurde die Position der Tiere so gewählt, dass sich die Thorax-Abdominal-Region (interessierende Organe: Herz, Lunge, Leber, Nieren, große Blutgefäße) im 8 cm großen Sichtfenster des Tomographen befand. Die Aufnahme erfolgte in Zeitintervallen (*frames*) von 15×10 s, 5×30 s, 5×60 s, 4×300 s und 9×600 s.

Die Datenauswertung der PET-Untersuchungen erfolgte durch die Festlegung dreidimensionaler ROIs (*region of interest*) in ausgewählten Organen und Strukturen (Herz, Leber, Nieren, Lunge) mittels der Software ROVER (ABX GmbH, Radeberg). Mit Hilfe der ROIs können Zeit-Aktivitätskurven erstellt werden, welche den zeitlichen Verlauf der Konzentration ^{18}F -markierter Substanzen in einer definierten Zielstruktur beschreiben und als Prozent des Maximums in dem jeweiligen Organ angegeben wurden. Unter Verwendung der Zeit-Aktivitätskurve des kardialen Blutgefäßsystems (aus ROI der Herzregion) wurde die mittlere Verweilzeit (MRT, *mean residence time*) von ^{18}F -S100A4 im Blut abgeschätzt. Dazu erfolgte für jedes Tier die Anpassung der Daten zu multiexponentiellen Gleichungen (ROI der Herzregion) unter Verwendung einer nichtlinearen Regressionsanalyse mit dem Programm SAAM II (*University of Washington, USA*). Die einzelnen Datenanpassungen stimmten weitgehend überein und ergaben folgende Dreixponenten-Gleichung: $A(t) = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + A_3 e^{-k_3 t}$, dabei ist $A(t) = \%$ der injizierten Dosis pro cm^3 . Die Verteilungs- bzw. Gewebe-Assoziations- ($t_{1/2}^{d/a}$; $t_{1/2} k_1 + t_{1/2} k_2$) und Eliminierungs- ($t_{1/2}^e$, $t_{1/2} k_3$) Halbwertszeiten wurden als $0.693/k$ berechnet. Zur Abschätzung der mittleren Verweilzeit in der Herzregion wurden die Zeit-Aktivitätskurve und der Bereich der Momentankurve mit Hilfe von Standardgleichungen nach Wolfe berechnet [185].

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Auftauen und Gefrierkonservierung von Zellen

Auftauen von Zellen

Das entsprechende Kryoröhrchen wurde aus dem Stickstofftank entnommen, sofort in ein Gefäß mit warmen, destillierten Wasser gegeben und nach einer kurzen Sprühdesinfektion unter die Sterilbank gestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension

zu 3-5 ml Kulturmedium in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und für 2 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden wie nachfolgend beschrieben mit Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst und in ein 15 ml-Röhrchen überführt (vgl. 2.6.2). Die Zellen wurden 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml der Zellsuspension (ca. $2-4 \times 10^6$ Zellen) wurde in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden für mindestens 24 h bei -70°C in einen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (*Mr. Frosty*, Nalgene™) gestellt, in welchem die Zellen allmählich mit $\sim 1^\circ\text{C}/\text{min}$ auf -70°C heruntergekühlt wurden. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.6.2 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden in 25 cm^2 bzw. 75 cm^2 Zellkulturflaschen bei 37°C und gesättigter Wasserdampfatosphäre bei einem CO_2 -Partialdruck von 5% kultiviert. Die adhärenenten Tumorzelllinien (A375, A2058, B16-F10, Mel-JUSO) wurden je nach Konfluenz und Durchführung von Experimenten zwei- bis dreimal wöchentlich passagiert und bis Passage 30 verwendet. Die dazu nötigen Arbeitsschritte wurden mit sterilen Materialien und in der Sterilbank durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen wurden mit 5 ml bzw. 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 μl bzw. 1 ml Trypsin/EDTA in die Kulturflasche gegeben und unter den angegebenen Bedingungen im Wärmeschrank für 3-5 min inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Klopfen vom Boden der Kulturflasche gelöst und in 4,5 ml bzw. 9 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml-Röhrchen gegeben. Für die jeweiligen Experimente erfolgte nun die Zellzahlbestimmung der Suspension (vgl. 2.6.3.). Die entsprechende Menge wurde in neue Zellkulturflaschen überführt und mit 5 ml bzw. 10 ml Endvolumen Kulturmedium aufgefüllt.

Die verwendeten Endothelzellen (HAEC) sind eine Primärzelllinie, die nur bis Passage 10 verwendet werden kann. Die Zellen wurden wöchentlich passagiert und 1:2 bis 1:5 verdünnt. Für die Umsetzung der Zellen einer 25 cm^2 Zellkulturflasche wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 750 μl Trypsin zu den Zellen gegeben, die Zellkulturflasche geschwenkt und 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden durch Klopfen vom Boden

gelöst, in 4 ml 10% FKS in PBS zur Neutralisation des Trypsins aufgenommen und in ein 15 ml-Röhrchen gegeben. Nach der Zentrifugation für 5 min bei $200 \times g$ wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert, gezählt und je nach Versuch entsprechend in eine neue Zellkulturflasche bzw. 96-*well*-Platte ausgesät.

2.6.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 μ l der Zellsuspension in ein Casy[®]-Röhrchen pipettiert und mit 10 ml Casy[®]ton-Lösung (isotonische Kochsalzlösung) verdünnt. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe des Zellzählgerätes Casy[®] Model TT automatisch nach Auswahl des entsprechenden Programms. Zur Berechnung des benötigten Volumens der Zellsuspension für nachfolgende Experimente wurde die ausgegebene Lebendzellzahl pro ml zugrunde gelegt. Weiterhin wurde der prozentuale Anteil vitaler Zellen in der Probe ausgegeben. Für weitere Untersuchungen sollte die Vitalität der Zellen mindestens 90% betragen.

2.6.4 Stabile Transfektion von A375-Melanomzellen

Die A375-Zellen wurden mit folgenden Plasmiden unter Verwendung des kationischen Reagenz *Lipofectamine*[™] stabil transfiziert: hS100A4-, mS100A4-, hRAGE-pIRES2-AcGFP1 und pIRES2-AcGFP1-Vektor. Bei dieser Transfektionsmethode interagieren kationische Liposomen, kleinste Tröpfchen mit einer äußeren Lipid-Doppelschicht, mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und bilden DNA-Lipid-Komplexe, welche durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

Für die Transfektion wurden nur Midi- bzw. Maxi-Plasmidpräparationen (vgl. 2.2.10) verwendet. Das Vektor-Plasmid hRAGE-pIRES2-AcGFP1 wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Susan Hoppmann kloniert. Dieses DNA-Plasmid wurde vor der Transfektion mit dem Restriktionsenzym ApaL1 linearisiert (vgl. 2.2.2) und unter Verwendung des *DNA Clean & Concentrator-25*[™]Kit gereinigt. Einen Tag vor der Transfektion wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen pro Kavität einer 6-*well*-Platte ausgesät, damit am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 80% pro *well* erreicht wurde. Die einzelnen Komponenten des Transfektionsreagenzes wurden zusammengegeben, leicht gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (**Tabelle 2-9**). Danach wurden die Reaktionsansätze A und B vereinigt und ebenfalls für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transfektion von hRAGE-pIRES2-AcGFP1 wurde *Lipofectamine*[™] 2000 verwendet. Dabei wurde Ansatz A ohne *PLUS*[™]Reagenz hergestellt. Daraufhin wurde von den

Zellen das Kulturmedium entfernt und nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 800 µl (pro well) serumfreies Medium *OPTI-MEM*[®] 1 (Invitrogen, Darmstadt) zu den Zellen gegeben. Die vereinigten Ansätze wurden tropfenweise zu den Zellen hinzugefügt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit Transfektionsreagenz abgenommen und durch normales Kulturmedium ersetzt.

Tabelle 2-9: Reaktionsansätze für Transfektion

Komponenten	Ansatz A (pro well)	Ansatz B (pro well)
<i>OPTI-MEM</i> [®] 1	100 µl	100 µl
DNA	2-4 µg	-
<i>PLUS</i> TM Reagenz	6 µl	-
<i>Lipofectamine</i> TM	-	4 µl

Nach zwei Tagen wurden alle Zellen eines wells in eine Zellkulturschale (Ø 100 mm) überführt und in Kulturmedium mit 1,2 mg/ml G418 (ein Neomycin-Derivat) selektioniert. Dabei starben alle Zellen, die kein pIRES2-AcGFP1-Plasmid enthielten aufgrund der nicht vorhandenen Neomycin-Resistenz ab. Nach 2-3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und gegebenenfalls auch ein Passagieren der Zellen. Nach einigen Wochen unter Selektionsdruck bildeten sich resistente Zellklone. Grünfluoreszierende Zellklone wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop identifiziert, markiert, mit Hilfe von *Cloning*-Zylindern von der Kulturschale abgelöst und in 24-well-Platten überführt. Diese vereinzelt Zellen wurden anschließend weiter kultiviert bis sie entsprechend ihrer Proliferation in eine 6-well-Platte und schließlich in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt werden konnten. Daraufhin erfolgte die automatische Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie (vgl. 2.6.5). Die Bezeichnungen der verwendeten Plasmide und der stabil transfizierten Zelllinien sind in **Tabelle 2-10** aufgezeigt.

Tabelle 2-10: Eigene Bezeichnungen der Plasmide und der stabil transfizierten Zelllinien

Bezeichnung Plasmid	Bezeichnung der Zelllinien
pIRES2-AcGFP1 (Firma Clontech, Frankreich)	A375-mock
hS100A4-pIRES2-AcGFP1	A375-hS100A4
mS100A4-pIRES2-AcGFP1	A375-mS100A4
hRAGE-pIRES2-AcGFP1	A375-hRAGE

h: human; m: maus

2.6.5 Durchflusszytometrie

Nach der Transfektion der Zellen mit den verschiedenen DNA-Plasmiden (hS100A4-, mS100A4-, human-RAGE-pIRES2-AcGFP1 und pIRES2-AcGFP1) wurden die Zellen, die das grünfluoreszierende Protein (AcGFP1) synthetisieren, angereichert, da diese aufgrund der IRES-Sequenz ebenso S100A4- (human, maus) bzw. RAGE-Protein in erhöhtem Maße synthetisieren. Die durchflusszytometrische Sortierung der Zellen erfolgte an einem *FACSAria™* II Zellsortiersystem, welches an der *FACS Facility* der Medizinischen Fakultät der TU Dresden am Institut für Physiologische Chemie genutzt werden konnte.² Für die Sortierung wurden die transfizierten Zellen von der Kulturflasche abgelöst (vgl. 2.6.2), in PBS aufgenommen und bei $200 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Es wurden ca. 1×10^7 Zellen in 2,5 ml PBS mit 2 mmol/l EDTA und 2% FKS (v/v) aufgenommen und mit einer 40 μ m-Filtermembran vereinzelt. Die Sortierung der stabil transfizierten A375-Zellen am *FACSAria™* II Zellsortiersystem erfolgte mit einer 70 μ m-Düse. Es wurden jeweils ca. 1×10^6 grün fluoreszierende Zellen automatisch in ein 15 ml-Röhrchen mit 5 ml Zellkulturmedium (vgl. 2.1.9) aufgefangen. Nach dem Rücktransport der Zellen auf Eis wurden diese einmal mit PBS gewaschen und zur weiteren Kultivierung zunächst in 25 cm² Zellkulturflaschen überführt.

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils der grün fluoreszierenden Zellen der transfizierten Zelllinien wurde regelmäßig eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Dafür wurden ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen in ein 15 ml-Röhrchen überführt und bei $200 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: $200 \times g$ für 5 min) und in 1 ml PBS resuspendiert und am Durchflusszytometer *FACSCalibur™* Software *CellQuest Pro* (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) analysiert. Es wurden insgesamt 20.000 Zellen in einer Ereignisregion gemessen. Die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen und die Fluoreszenzintensität der Zellen wurden in einem Histogramm dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur stabil transfizierte Zellpopulationen verwendet, die aus mindestens 90% grün fluoreszierenden Zellen bestanden.

² Die technische Assistenz bei der Zellsortierung erfolgte durch Frau Susann Höfner bzw. Manuela Günther vom Institut für Physiologische Chemie an der Medizinischen Fakultät der TU Dresden.

2.6.6 Untersuchung der Zellproliferation

Die A375- und stabil transfizierten A375-Zellen (hS100A4, mS100A4, mock) wurden hinsichtlich ihrer Zellproliferation untersucht. Drei Tage vor Versuchsbeginn wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät, so dass die Zellen zu Beginn des Versuches ungefähr zu 80% konfluent waren. Am ersten Versuchstag wurden davon 1×10^5 Zellen pro Kavität einer 6-well-Platte in 2 ml Kulturmedium ausgesät. Nach 24, 48, 72, 96 und 120 h Kultivierung bei 37°C wurde von je 3 wells die Zellzahl bestimmt (vgl. 2.6.3). Die automatische Zellzählung wurde für jede Kavität zweimal durchgeführt.

2.6.7 Untersuchung der Zellmotilität

Die A375- und stabil transfizierten A375-Zellen (hS100A4, mS100A4, mock) wurden hinsichtlich ihres Motilitätsverhaltens mit dem Wundheilungs- bzw. *Scratch*-Assay untersucht. Dabei wird die Beweglichkeit der Zellen auf eine im Zellrasen mechanisch zugefügte Verletzung bestimmt.

Es wurden 2×10^6 Zellen in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät und für ca. 24 h unter den angegebenen Zellkulturbedingungen (vgl. 2.6.2) kultiviert. Dadurch waren die Zellen zu Beginn des Versuches ungefähr zu 80% konfluent. Es wurden 1×10^6 Zellen in 2 ml Kulturmedium pro Kavität einer 6-well-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Mit einer 200µl-Pipettenspitze wurden nun mehrere „Kratzer“ in vertikaler Richtung in den Zellrasen gezogen. Dabei wurde die Pipettenspitze von seitlich nach aufwärts gedreht. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Kavitäten zweimal mit PBS gewaschen und 2 ml frisches Kulturmedium pro well hinzugefügt. Daraufhin wurde jeweils ein „Kratzer“ mit einer Breite zwischen ca. 280 und 300 µm bei 10-facher Vergrößerung mit dem Mikroskop *Axiovert 40 CFL* gesucht. Für jeden „Kratzer“ wurden die X/Y-Koordinaten am Objektführer des Mikroskoptisches notiert und ein Bild aufgenommen. Nach 4, 6, 8 und 10 h erfolgte die erneute Aufnahme der „Kratzer“, um die Bewegung der Zellen zum Schließen des Spaltes zu dokumentieren. Für die Auswertung wurde für jedes Bild bzw. jeden Zeitpunkt die Breite des Spaltes an fünf definierten Stellen im Bild unter Verwendung der Software *Axiovision Rel.4.6.10* (Carl Zeiss, Jena) gemessen.

2.6.8 Untersuchung der Zelladhäsion

Die A375- und stabil transfizierten A375-Zellen (hS100A4, mS100A4, mock) wurden hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens an Fibronectin untersucht. Fibronectin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix.

Zunächst wurde eine 24-*well*-Platte mit Fibronectin beschichtet: Dazu wurden 300 µl Fibronectin (10 µg/ml in PBS) in ein *well* gegeben und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Des Weiteren wurden 1×10^6 Zellen in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät und ebenfalls für ca. 24 h unter den angegebenen Zellkulturbedingungen (vgl. 2.6.2) kultiviert, so dass zu Beginn des Versuches ungefähr eine 80%ige Konfluenz der Zellen gegeben war. Am nächsten Tag wurde die 24-*well*-Platte zweimal mit PBS gewaschen und zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen mit 2% BSA (w/v) in PBS (300 µl pro *well*) für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 mmol/l EDTA in PBS (500 µl) von der Kulturflasche abgelöst, in 4,5 ml PBS aufgenommen und bei 200 × g für 5 min zentrifugiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden (Zentrifugation: 200 × g für 5 min), erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets in 4 ml 1%igem BSA (w/v) in Kulturmedium sowie die Bestimmung der Zellzahl (vgl. 2.6.3). Daraufhin wurden 5×10^5 Zellen (in 1% BSA (w/v) in Kulturmedium) pro *well* zu der mit Fibronectin-beschichteten 24-*well*-Platte gegeben (500 µl pro *well*) und für 40 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit PBS gewaschen, um nicht adhären Zellen zu entfernen. Die Fixierung der adhären Zellen erfolgte durch Zugabe von 50% Methanol in PBS (v/v, 500µl pro *well*) für 5 min und 100% Methanol (500µl pro *well*) für 10 min. Zur Quantifizierung der adhären Zellen wurden die Zellkerne mit einer Kristallviolett-Lösung (250 µl pro *well*) für 15 min unter Schütteln gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser (1 × 1 ml pro *well*, 2 × 500 µl pro *well*) wurde die Platte für ca. 1-2 h an der Luft getrocknet. Danach wurden die Zellen mit 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS (250 µl pro *well*) für 5 min unter Schütteln lysiert und der Farbstoff herausgelöst. Die Farblösung wurde gut durchmischt und in Doppelbestimmung wurde aus jedem *well* 100 µl in eine 96-*well*-Platte überführt und die Absorption bei 550 nm sowie zur Ermittlung des Hintergrundsignals bei der Referenzwellenlänge von 650 nm photometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgte unter Abzug des Leerwertes folgendermaßen: $OD_{550} - OD_{650}$.

2.6.9 Untersuchung der Zellmigration

Die A375- und stabil transfizierten A375-Zellen (hS100A4, mS100A4- mock) wurden hinsichtlich ihres Migrationsverhalten durch eine Membran untersucht. Eine solche Untersuchung wird als Boyden-Kammer-, Filter- bzw. Transwell-Migrationsversuch bezeichnet [186]. In eine 24-well-Platte wird ein Zellkultureinsatz mit einer Kapillarporenmembran aus Polyester (8 µm Porendurchmesser) eingehängt, wodurch die Kavität in zwei Kompartimente aufgeteilt wird (**Abbildung 2-3**). Die Zellen werden in den Zellkultureinsatz gegeben und migrieren aktiv durch die Porenmembran entlang eines steigenden FKS-Konzentrationsgradienten. Aufgrund des geringen Porendurchmessers der Membran kommt es bei den Zellen zu Zytoskelettveränderungen.

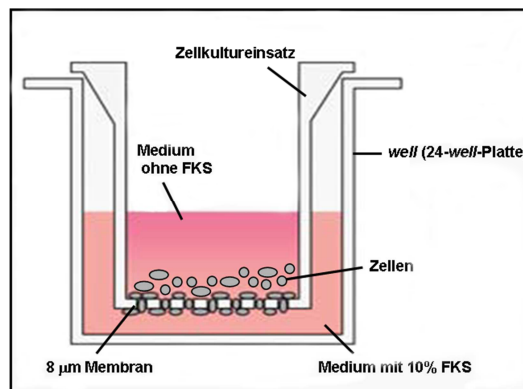


Abbildung 2-3: Prinzip Migrationsversuch

Es wurden 2×10^6 Zellen in 25 cm^2 Kulturflaschen ausgesät und für ca. 24 h unter den angegebenen Zellkulturbedingungen (vgl. 2.6.2) kultiviert. Dadurch waren die Zellen zu Beginn des Versuches ungefähr zu 80% konfluent. Daraufhin wurde das Zellkulturmedium entnommen, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für weitere 24 h in 0,2% BSA (w/v) in Kulturmedium ohne FKS kultiviert. Unter diesen Bedingungen findet keine Zellteilung mehr statt, so dass nur die Migrationsfähigkeit der Zellen untersucht wird. Diese Zellen wurden nun mit 500 µl Trypsin von der Kulturflasche gelöst, in PBS aufgenommen und bei $200 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml 0,2%igem BSA (w/v) in Kulturmedium ohne FKS aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt (vgl. 2.6.3). Es wurden jeweils 600 µl Kulturmedium mit und ohne 10% (v/v) FKS in eine Kavität der 24-well-Platte gegeben (unteres Kompartiment) und 2×10^5 Zellen in 0,2%igem BSA (w/v) in Kulturmedium oben in jeden Zellkultureinsatz überführt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurde das

Kulturmedium sowohl aus den Zellkultureinsätzen als auch aus den *wells* der 24-*well*-Platte (unteres Kompartiment) vorsichtig entfernt. Zum Anfärben der Zellen, die durch die Membran in Richtung unteres Kompartiment mit 10%FKS migriert sind, wurde in jedes *well* 450 µl Calcein in *OPTI-MEM*[®] 1 (4 µg/ml) gegeben und 1 h im Dunkeln (Alufolie) bei 37°C inkubiert. Damit sollten die Zellen an der Unterseite der Kapillarporenmembran gefärbt werden. Die Zellkultureinsätze mit den angefärbten Zellen wurden in eine neue 24-*well*-Platte mit 37°C-warmen Trypsin (500 µl pro Kavität) gegeben und für 10 min bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Dadurch sollten sich die Zellen von der Membranunterseite lösen. Nun wurden von jedem *well* in Doppelbestimmung 200 µl der Zell-Trypsin-Lösung in eine schwarze 96-*well*-Mikrotiterplatte gegeben und die Fluoreszenz im Photometer bestimmt (Exzitation 485 nm; Emission 528 nm). Für die Auswertung wurden die Fluoreszenzeinheiten (abzüglich des Leerwertes) der Migration zu Kulturmedium ohne FKS (ungerichtete, zufällige Zellbewegung) von der Migration zu 10% FKS (direkte Zellbewegung) abgezogen.

2.6.10 Untersuchung der Zellinvasion

Die A375- und stabil transfizierten A375-Zellen (hS100A4, mS100A4, mock) wurden hinsichtlich ihres Invasionsvermögens durch eine Matrigel-Matrix untersucht. Matrigel ist eine gelöste Basalmembran-Präparation aus einem Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom. Dies ist ein Tumor mit vielen extrazellulären Matrix-Proteinen. Die Hauptkomponenten sind Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykan und Entaktin.

Es wurde wie bei der Untersuchung des Migrationsverhaltens (vgl. 2.6.9) eine 24-*well*-Platte mit Zellkultureinsätzen verwendet. Zusätzlich wurde die Kapillarporenmembran (8 µm Porendurchmesser) mit Matrigel beschichtet. Die Zellen wurden in den Zellkultureinsatz gegeben und migrierten aktiv durch die Matrigelschicht und die Porenmembran entlang eines steigenden FKS-Konzentrationsgradienten (**Abbildung 2-4**).

Das Matrigel (7,5 mg/ml) wurde nach Herstellervorschrift über Nacht, auf Eis und bei 4°C aufgetaut und anschließend auf Eis mit serumfreiem Medium (*OPTI-MEM*[®] 1) 1:3 verdünnt. Daraufhin wurde vorsichtig in jede Kavität 100 µl Matrigellösung gegeben und zur Gelierung des Matrigels wurde die ganze Platte für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert.

Die Vorbereitung der Zellen, das weitere Vorgehen und die Auswertung erfolgte entsprechend der Angaben bei der Untersuchung des Migrationsverhaltens (vgl. 2.6.9).

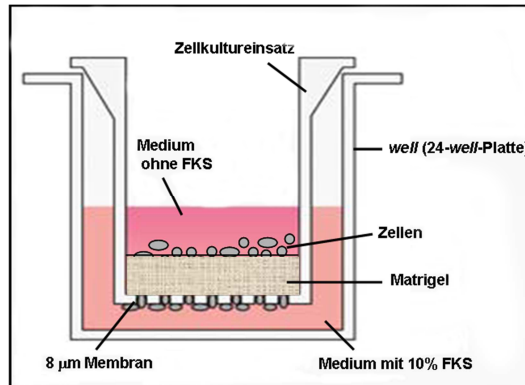


Abbildung 2-4: Prinzip Invasionsversuch

2.6.11 Bestimmung von extrazellulärem S100A4 aus Zellkulturüberständen

Die A375- und die stabil transfizierten A375-Zellen (hS100A4, mS100A4, mock) wurden hinsichtlich ihrer S100A4-Sekretion in das umgebende Zellkulturmedium mittels zweier unabhängiger Methoden untersucht:

Es wurden 3×10^5 Zellen in 2 ml Kulturmedium pro Kavität einer 6-well-Platte für 3 Tage unter den angegebenen Bedingungen (vgl. 2.6.2) kultiviert. Daraufhin wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden für weitere 24 h in 800 µl frischem Kulturmedium pro Kavität inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium abgenommen, bei $290 \times g$ für 10 min zentrifugiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Die Bestimmung der extrazellulären S100A4-Konzentration im Kulturmedium der Zellen erfolgte unter Verwendung des *Circulex™ S1004 ELISA Kits* nach Herstellerangaben. Die einzelnen Proben wurden in Doppelbestimmungen durch Messung der photometrischen Absorption bei 450 nm sowie zur Ermittlung des Hintergrundsignals bei der Referenzwellenlänge von 550 nm analysiert. Die Auswertung erfolgte unter Abzug des Leerwertes folgendermaßen: $\text{OD}_{450} - \text{OD}_{550}$. Um vergleichende Aussagen zwischen den einzelnen Proben vornehmen zu können, wurden die Absorptionswerte auf die jeweilige Proteinkonzentration bezogen.

Zusätzlich wurde die S100A4-Sekretion von A375-, A375-hS100A4-, A375-mS100A4- und A375-mock-Zellen in das umgebende Zellkulturmedium mit Western Blot und anschließender Immundetektion (vgl. 2.3.8) nachgewiesen. Dazu wurden 2×10^6

Zellen in 2 ml Kulturmedium pro Kavität eine 6-*well*-Platte ausgesät. Nach 48 h wurde das Zellkulturmedium mit 10% FKS entfernt und durch 800 µl Kulturmedium mit 0,2% FKS ersetzt, da ein zu hoher Serumanteil das Laufverhalten der SDS-PAGE beeinträchtigen und damit den S100A4-Proteinnachweis stören würde. Nach weiteren 24 h wurde die 6-*well*-Platte bei 500 × g für 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde entnommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Für das 15%ige SDS-Polyacrylamid-Gel wurde der Zellkulturüberstand mit SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 99°C inkubiert und die Proteine entsprechend der Vorgehensweise (vgl. 2.3.7) getrennt. Der Nachweis von extrazellulärem S100A4 auf der Membran erfolgte mit einem spezifischen S100A4-Antikörper.

2.6.12 Bestimmung der NF-κB-Aktivierung in Zellkernextrakten

Die Wirkung von extrazellulärem S100A4 in Zellkulturüberständen von stabil transfizierten A375-hS100A4-Zellen auf die NF-κB-Aktivierung in nicht-transfizierten A375-Zellen erfolgte mit dem *NFκB-p65-Transkriptionsfaktor-Kit*, wobei die DNA-Bindungsaktivität der NF-κB-Untereinheit p65 bestimmt wurde.

Der Transkriptionsfaktor NF-κB kommt in fast allen Zellen vor und induziert die Expression von zahlreichen Genen, die bei Immunantworten, Entwicklungsprozessen, Entzündung und Erkrankungen wie z. B. Krebs eine Rolle spielen. Die NF-κB-Familie besteht in Säugerzellen aus fünf Mitgliedern: NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2 (p100/p52), RelA (p65), RelB und c-Rel, die zumeist als Homo- bzw. Heterodimere vorliegen (meist p50/p65-Heterodimer bzw. p50-Homodimer). NF-κB-Dimere sind im Zytoplasma an IκB-Proteine gebunden und werden dadurch in einem inaktiven Zustand gehalten. Die Aktivierung von NF-κB kann durch verschiedene Stimuli erfolgen. Beim klassischen Weg werden dadurch die IκB-Proteine phosphoryliert, ubiquitiniert und abgebaut, wodurch die NF-κB-Dimere freigesetzt werden, in den Zellkern translozieren und nach Bindung an die DNA die Transkription regulieren.

Zur Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität der NF-κB-Untereinheit p65 wurde nach Herstellerangaben vorgegangen: Es wurden 10 µl der präparierten Zellkernextrakte (vgl. 2.3.6) auf eine Mikrotiterplatte gegeben, die mit doppelsträngigen, die NF-κB-Konsensussequenz (5'-GGGACTTCC-3') enthaltenen Oligonukleotiden immobilisiert war und für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe eines spezifischen primären Antikörpers gegen NF-κB-p65 sowie eines HRP-konjugierten sekundären Antikörpers. Die Bindungsaktivität der p65-Untereinheit in den einzelnen Proben wurde

durch Messung des Chemilumineszenzsignals am Photometer *Synergy 4* bestimmt. Um vergleichende Aussagen zwischen den einzelnen Proben vornehmen zu können wurde das Chemilumineszenzsignal auf die jeweilige Proteinkonzentration der Probe bezogen.

2.7 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die A375- und stabil transfizierten A375-Zellen (hS100A4, mS100A4, mock) wurden hinsichtlich ihres In-vivo-Verhaltens nach subkutaner und intravenöser Injektion in Nacktmäuse untersucht.

2.7.1 Untersuchung des subkutanen Tumorwachstums

Die A375- und stabil transfizierten A375-Zellen wurden unter den angegebenen Bedingungen kultiviert (vgl. 2.6.2). Drei Tage vor Versuchsbeginn erfolgte jeweils die Aussat von 2×10^6 Zellen in 75 cm² Kulturflaschen, so dass die Zellen zu Beginn des Versuches ungefähr zu 80% konfluent waren. Nach Entnahme der benötigten Zellen wurden diese bei $200 \times g$ für 5 min zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Zellpellet in 0,9% (v/v) isotonischer Kochsalzlösung resuspendiert und 100 µl Kochsalzlösung mit 5×10^6 Zellen wurden subkutan in den rechten Oberschenkel einer Nacktmaus injiziert. Zuvor erfolgte die Betäubung der Nacktmäuse mit 12% (v/v) Desfluran in einem Luft-Sauerstoff-Gemisch aus 700 ml/min Luft und 300 ml/min Sauerstoff bei einem Gasfluss von 1000ml/min sowie die Desinfektion der Injektionsregion.

Zur Erfassung des Tumorwachstums wurde alle zwei bis drei Tage die Länge und Breite der Tumore mit Hilfe eines digitalen Messschiebers (Tchibo direct GmbH, Hamburg) bestimmt, wobei die erste Messung eine Woche nach der Injektion erfolgte. Die Berechnung des Tumolvolumens erfolgte nach folgender Formel:

$$V_{\text{Tumor}} [\text{mm}^3] = \frac{\pi}{6} \times \text{Tumurlänge} [\text{mm}] \times \text{Tumorbreite}^2 [\text{mm}]^2.$$

Zusätzlich wurde über die gesamte Dauer der Versuchsreihe das Körpergewicht der Versuchstiere bestimmt, wodurch deren Gesundheitszustand gut überwacht werden konnte. Weiterhin wurden mit dem KODAK *In-vivo-Imaging System FX-Pro* Weißlicht- und Fluoreszenz-Aufnahmen (Exzitation bei 480 nm, Emission bei 535 nm) von

narkotisierten Mäusen mit subkutanen Tumoren erzeugt. Dadurch konnte die AcGFP1-Fluoreszenz der transfizierten Zellen im Tumorverband während des gesamten Versuches überprüft werden. Die Tötung der Tiere erfolgte 23 Tage nach Versuchsbeginn durch die Inhalation von Kohlendioxid. Es wurde die Bauch- und Brusthöhle der Tiere eröffnet und die Organe sowohl makroskopisch als auch im KODAK *In-vivo-Imaging System FX-Pro* auf fluoreszierende Veränderungen, insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von Metastasen untersucht.

2.7.2 Untersuchung des Metastasierungsverhaltens

Die A375- und stabil transfizierten A375-Zellen wurden entsprechend der im Abschnitt 2.7.1 beschriebenen Vorgehensweise für die Injektion vorbereitet und in 0,9% (v/v) isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen. Es wurden 300 µl Kochsalzlösung mit 1×10^6 Zellen intravenös in die Schwanzvene einer Nacktmaus injiziert. Für die Injektion war keine Betäubung der Nacktmäuse notwendig, die Tiere wurden nur kurzzeitig in einer Kunststoffröhre immobilisiert. Für jede Zelllinie wurden jeweils 9 Tiere verwendet. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 16 Wochen hinsichtlich äußerlicher Auffälligkeiten wie Verhaltensänderungen, Gewichtsverlust und Atmungsstörungen beobachtet. Zum Versuchsende wurden exemplarisch einige Tiere getötet, die Bauch- und Brusthöhle eröffnet und die Organe sowohl makroskopisch als auch im KODAK *In-vivo-Imaging System FX-Pro* auf fluoreszierende Veränderungen, insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von Metastasen untersucht.

2.8 Statistik

In der vorliegenden Arbeit wurden alle aufgenommenen Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm OriginPro 8 G SR2 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Zum Vergleich der einzelnen Datengruppen wurde die Varianzanalyse ANOVA mit der PostHoc-Analyse nach Bonferroni angewendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ ($p < 0,05$) angenommen.

3 ERGEBNISSE

Die Interaktion zwischen S100A4 und RAGE wurde anhand von In-Vitro-Bindungs- und Zellassoziationsstudien sowie mittels Untersuchungen an Wistar-Ratten studiert. Dafür wurde rekombinante S100A4-Protein in ausreichender Menge und guten Reinheitsgraden hergestellt, charakterisiert und radioaktiv markiert.

3.1 Herstellung von rekombinantem S100A4-Protein

3.1.1 Klonierung des humanen S100A4-Gens in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-6P-1

Zur Gewinnung von rekombinantem S100A4-Protein in *E. coli* wurde der Proteinexpressionsvektor pGEX-6P-1 verwendet, welcher die Herstellung eines GST-Fusionsproteins erlaubt (**Abbildung 3-1 A**). Dafür wurde aus der RNA von THP-1-Zellen die kodierende cDNA-Sequenz für S100A4 mittels RT-PCR amplifiziert. Diese cDNA wurde in einer zweiten PCR-Reaktion mit der Primerkombination hS100A4-BamHI und hS100A4-NotI (vgl. **Tabelle 2-2**) amplifiziert, so dass am 5'-Ende der Sequenz eine BamHI- und am 3'-Ende eine NotI-Schnittstelle angefügt wurde. Das resultierende Amplikon wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und zeigte die erwartete Länge von 356 bp (**Abbildung 3-1 B**).

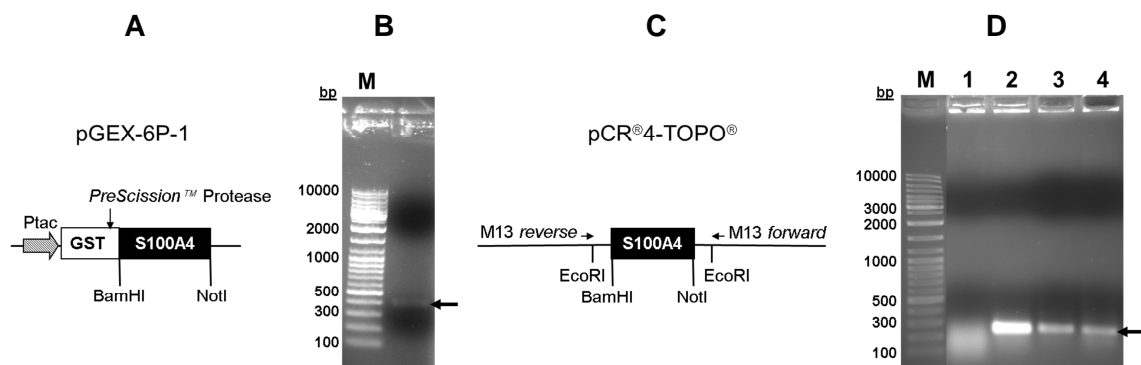


Abbildung 3-1: Klonierung des S100A4-Gens in den Vektor pGEX-6P-1: Vorgehen und Ergebnisse

(A) Schematische Darstellung von S100A4 im Vektor pGEX-6P-1. Eingezeichnet sind die Restriktionsschnittstellen BamHI und NotI sowie der Erkennungsbereich der *PreScission*TM Protease. (B) 1,5%iges Agarose-Gel nach Ethidiumbromid-Färbung zeigt das gereinigte S100A4-PCR-Produkt mit den eingefügten BamHI- und NotI-Schnittstellen (356 bp, Pfeil). (C) Schematische Darstellung des S100A4-Gens im pCR®4-TOPO®-Vektor. Eingezeichnet sind die Sequenzierungsprimer M13 reverse und M13 forward sowie die Restriktionsschnittstellen im Ausgangsvektor (EcoRI) und im klonierten S100A4-PCR-Produkt. (D) Die Ligation von S100A4 und pCR®4-TOPO® und die Transformation in *E. coli*-TOP10-Zellen wurde mit einer Kolonie-PCR überprüft. Das 1,5%ige Agarose-Gel nach Ethidiumbromid-Färbung zeigt in den Spuren 2,3 und 4 die PCR-Produkte das native S100A4-Fragment mit einer Länge von 209 bp (Pfeil). Spur M: DNA-Größenmarker

Das S100A4-PCR-Produkt mit den eingefügten Schnittstellen wurde zunächst in den pCR[®]4-TOPO[®]- Vektor kloniert (**Abbildung 3-1 C**) und in *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert. Nach Vermehrung und Plasmidpräparation des rekombinanten Vektors erfolgte die Überprüfung der korrekten Ligation mit einer Kolonie-PCR unter Verwendung von S100A4-spezifischen Oligonukleotiden (vgl. **Tabelle 2-2**). Das native S100A4-Fragment mit einer Länge von 209 bp wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese in 3 Kolonien (Spur 2, 3, 4) nachgewiesen (**Abbildung 3-1 D**).

Im nächsten Schritt wurden die Plasmide pGEX-6P-1 und pCR[®]4-TOPO[®]-S100A4 mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und NotI linearisiert. Die Reaktionsansätze wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, um die mit BamHI- und NotI-Überhängen (*sticky ends*) versehenen Fragmente zu extrahieren. Nach elektrophoretischer Trennung wurde der pGEX-Vektor mit einer Länge von 4954 bp (**Abbildung 3-2 B**) und das S100A4-Fragment bei 337 bp (**Abbildung 3-2 A**, Pfeil) detektiert (**Abbildung 3-2 A**, Pfeil). Beide Fragmente wurden anschließend miteinander ligiert und in *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert. Der Erfolg der Ligation wurde mit einer Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer hS100A4-BamHI und hS100A4-NotI überprüft (vgl. **Tabelle 2-2**). Die Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese ergab, dass fünf Kolonien (Spur 2, 3, 4, 5, 6) das korrekte Fragment mit einer Länge von 337 bp enthielten (**Abbildung 3-2 C**).

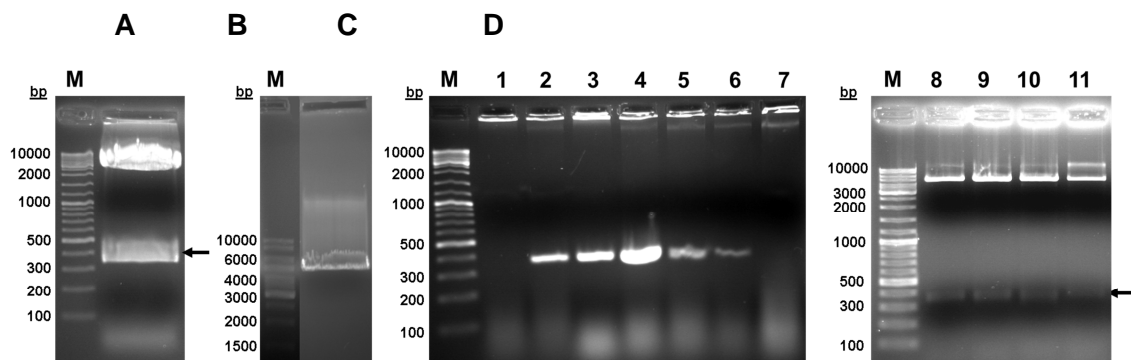


Abbildung 3-2: Ergebnisse der Klonierung des humanen S100A4-Gens in den Vektor pGEX-6P-1
Gezeigt sind Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele nach der Elektrophorese. (A) Restriktionshydrolyse von pCR[®]4-TOPO[®]-S100A4 mit BamHI und NotI. (B) Restriktionshydrolyse von pGEX-6P-1 mit BamHI und NotI. (C) Zur Überprüfung der Ligation von S100A4 und pGEX-6P-1 wurde eine Kolonie-PCR mit den Primern hS100A4-BamHI und hS100A4-NotI durchgeführt. Gezeigt sind die PCR-Produkte von 6 Kolonien (Spur 2, 3, 4, 5, 6). Spur 7 zeigt die Ligation ohne Vektor. (D) Von den Kolonien 2, 3, 4 und 5 wurde die Plasmid-DNA isoliert und eine Restriktionshydrolyse mit BamHI und NotI durchgeführt. Der Pfeil zeigt das S100A4-Fragment mit den eingefügten Schnittstellen von 337 bp. Spur M: DNA-Größenmarker

Die Kolonien 2, 3, 4 und 5 wurden in entsprechendem Selektionsmedium vermehrt und die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation

wurde eine Restriktionshydrolyse mit den Enzymen BamHI und NotI durchgeführt und mittels Gelelektrophorese das korrekte S100A4-Fragment mit einer Länge von 337 bp nachgewiesen (**Abbildung 3-2 D**). Nach der Überprüfung der Sequenz des Expressionsvektors pGEX-6P-1-S100A4 mit einer Sequenzanalyse³, wurde der Vektor für die Expression des S100A4-GST-Fusionsproteins verwendet werden.

3.1.2 Gewinnung und Reinigung des humanen S100A4-Proteins

Für die Synthese von rekombinantem S100A4 als Fusionsprotein mit einem N-terminalen GST-Epitop wurde das Expressionsplasmid pGEX-6P-1-S100A4 in den *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Die Expressionskultur wurde bei 37°C angezogen und die Induktion der Proteinbiosynthese erfolgte bei einer Optischen Dichte (OD_{600}) von 0,8-1,0 mit IPTG (1 mmol/l). Nach vier Stunden bei 25°C im Inkubationsschüttler wurden die Zellen lysiert und S100A4 in zwei sequentiellen Schritten bestehend aus einer Affinitätschromatographie mit GST-Agarose und einer anschließenden Größenausschlusschromatographie über eine *Superdex™* 75-Säule gereinigt (2.3.2). Das Ergebnis der einzelnen Reinigungsschritte ist in einer SDS-PAGE nach Färbung mit Coomassie-Blau in **Abbildung 3-3** dargestellt.

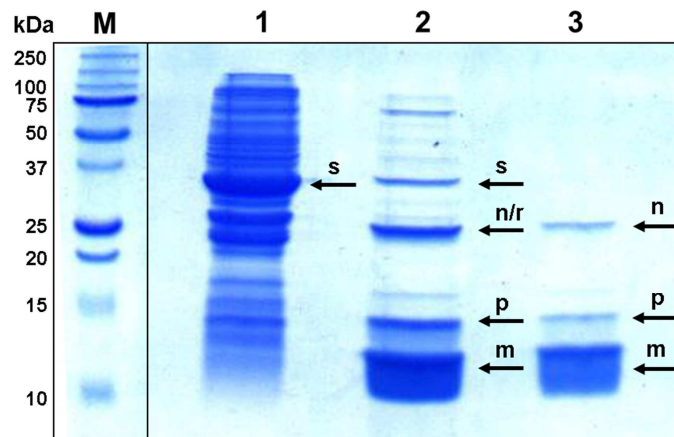


Abbildung 3-3: Ergebnis der Proteinbiosynthese und Reinigung von rekombinantem S100A4 [187]
SDS-PAGE (15%) nach Coomassie-Blau-Färbung zeigt die einzelnen Schritte der Proteinreinigung. Spur 1: *E. coli*-Zelllysate 1:10 mit SDS-Probenpuffer verdünnt; Spur 2: Fraktion nach der GST-Affinitätschromatographie und Abspaltung des GST-Epitops durch die *Precission™* Protease; Spur 3: 6 µg rekombinantes S100A4-Protein nach der Größenausschlusschromatographie in PBS pH 7,3. Die Pfeile zeigen das GST-S100A4-Fusionsprotein (s) bei 38 kDa, gespaltenes GST (r) bei 26 kDa, das S100A4-Monomer (m) bei 12 kDa, das SDS-resistente S100A4-Dimer (n) bei 24 kDa sowie eine unbekannte Proteinverunreinigung (p) bei 14 kDa. Spur M: Proteingrößenstandard

³ Die Sequenzierung der klonierten Plasmid-Vektoren erfolgte durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) mit firmeneigenen Vektor-spezifischen Primern.

In Spur 1 des Polyacrylamid-Gels erscheint das GST-S100A4-Fusionsprotein als Proteinbande bei 38 kDa (s). Nach der Affinitätschromatographie und der Abspaltung des GST-Epitops durch die *Precission*TM Protease (Spur 2) sind noch eine Reihe von Proteinbanden wie z. B. ungespaltenes GST-S100A4-Fusionsprotein (s), abgespaltene Glutathion-S-Transferase (r) sowie S100A4-Monomer (m) und S100A4-Dimer (n) vorhanden. In der nachfolgenden Größenausschlusschromatographie (Spur 3) konnten diese Verunreinigungen größtenteils entfernt werden. Die intensive Proteinbande bei 12 kDa zeigt das S100A4-Protein als Monomer (m) und bei 24 kDa als SDS-resistentes Dimer (n). Die Proteinbande bei 14 kDa konnte mittels hochauflösender Massenspektrometrie (nanoLC-ESI-MSMS) bei der Firma Proteome Factory AG (Berlin) einem Fragment der Glutathion-S-Transferase aus *E. coli* zugeordnet werden. Allerdings wurde aufgrund der ähnlichen molekularen Masse zum S100A4-Monomer keine Trennung mit der Größenausschlusschromatographie erreicht. Der Reinheitsgrad des rekombinanten S100A4-Proteins wurde densitometrisch bestimmt und lag bei ungefähr 92%. Dabei konnten 87% dem Monomer und 5% dem SDS-resistenten Dimer zugeordnet werden.

3.1.3 Identifizierung des humanen S100A4-Proteins

Zur Identifizierung des gereinigten humanen S100A4-Proteins wurden eine Western-Blot- und eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt.

Im Anschluss an die SDS-PAGE (**Abbildung 3-4 A**) wurde ein Western Blot mit einem spezifischen S100A4-Antikörper durchgeführt. Es konnte wiederum das S100A4-Monomer bei 12 kDa und das SDS-resistente S100A4-Dimer bei 24 kDa nachgewiesen werden (**Abbildung 3-4 B**).

In einem MALDI-TOF-Massenspektrometer ist das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung (m/z) dem Quadrat der Flugzeit proportional. Damit lässt sich die Masse aus der gemessenen Flugzeit ermitteln. Es werden hauptsächlich einfach geladene Ionen $[M+H]^+$ beobachtet. Bei Proteinen treten neben einfach geladenen Dimerionen $[2M+H]^+$, auch doppelt $[M+2H]^{2+}$ oder dreifach geladene Ionen $[M+3H]^{3+}$ auf.

Das Massenspektrum des S100A4-Proteins in **Abbildung 3-4 C** zeigt spezifische Signale bei $m/z = 12.356$ Da (m), $m/z = 24.705$ Da (n), $m/z = 14.852$ Da (p) sowie die zweifach geladenen Ionen $[M+2H]^{2+}$ bei $m/z = 6.176$ Da (l). Der Peak bei 12.356 Da (m) stimmt mit der kalkulierten molekularen Masse des monomeren S100A4-Proteins von 12.338 Da überein. Im Vergleich zum nativen S100A4-Protein enthält das in der vorliegenden Arbeit hergestellte rekombinante S100A4-Protein am

N-Terminus zusätzlich acht Aminosäuren (GPLGSVM), die aufgrund der Spaltung durch die *PreScission™* Protease an definierter Stelle im GST-S100A4-Fusionsprotein zustande kommen (**Abbildung 3-4 D**). Der Peak bei 24.705 Da (n) entspricht dem S100A4-Dimer. Die Proteinverunreinigung (p) ist bei einer Molmasse von 14.852 Da zu sehen (**Abbildung 3-4 C**).

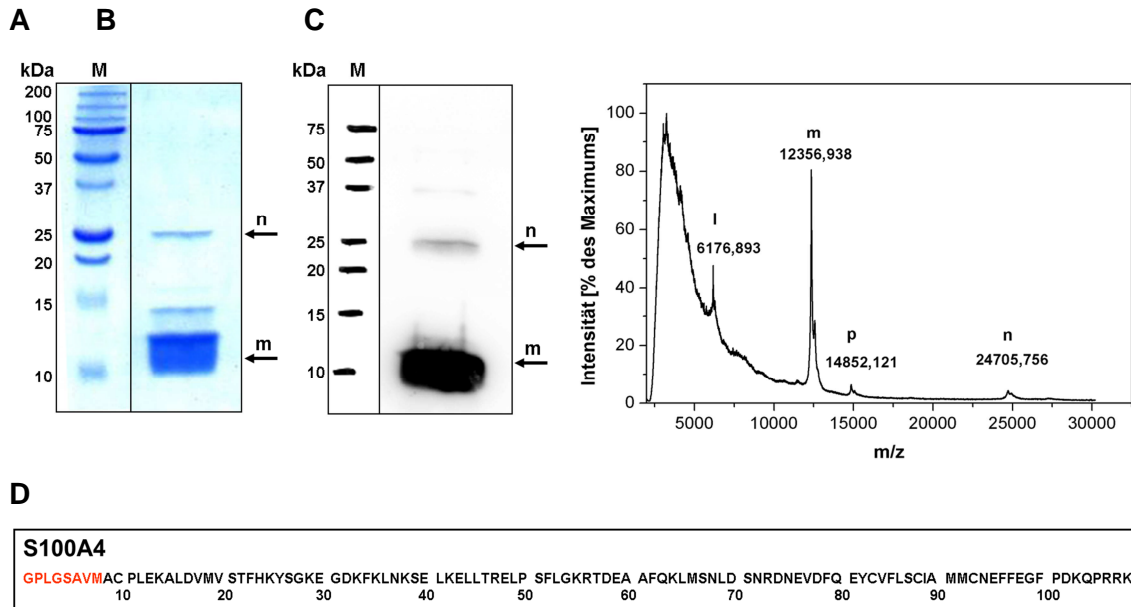


Abbildung 3-4: Identifizierung des rekombinanten S100A4-Proteins [187]

(A) Spur 3 der SDS-PAGE (15%) nach Coomassie-Blau-Färbung aus **Abbildung 3-3**. (B) Western Blot von (A) mit einem spezifischen S100A4-Antikörper. Pfeile zeigen das S100A4-Monomer (m) bei 12 kDa und das SDS-resistente S100A4-Dimer (n) bei 24 kDa. Spur M: Proteingrößenstandard (C) MALDI-TOF-Massenspektrum von S100A4. Zu sehen sind die Signale der $[M+H]^+$ -Ionen des S100A4-Monomers (m), der $[2M+H]^+$ -Ionen des S100A4-Dimers (n), der $[M+2H]^{2+}$ - bzw. $[2M+2H]^{2+}$ -Ionen von m (l) sowie des GST-Fragmentes (p). (D) Das gereinigte, rekombinante S100A4-Protein besteht aus 108 Aminosäuren. Die im Vergleich zum nativen S100A4-Protein zusätzlichen acht Aminosäuren (GPLGSVM) am N-Terminus sind rot hervorgehoben.

3.2 In-vitro-Bindung von S100A4 an sRAGE

Die Interaktion zwischen rekombinantem S100A4 und sRAGE wurde mit der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR) untersucht. Die SPR-Methode ermöglicht die Charakterisierung der Reaktionskinetik sowie die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten von Protein-Protein-Interaktionen.

Als Ligand wurden 20 µg/ml rekombinanter sRAGE (vgl. 2.3.4) kovalent über dessen freie Aminogruppen an N-Hydroxysuccinimid(NHS)-aktivierte Carboxylgruppen des CM5-Sensorchips (carboxymethylierte Dextran-Matrix) gekuppelt. Es wurde eine Immobilisierung von ca. 5.200 (4.300-6.100) Resonanzeinheiten an sRAGE-Protein

erreicht (vgl. 2.4.2). **Abbildung 3-5** zeigt ein repräsentatives Bindungsexperiment, bei dem S100A4 in steigenden Konzentrationen (2,5-20 $\mu\text{mol/l}$) für jeweils 2 Minuten über die Sensorchipoberfläche geleitet wurde. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Assoziation, d. h. eine Zunahme der Signalintensität in Abhängigkeit von der S100A4-Konzentration auf dem sRAGE-Sensorchip beobachtet werden. Ebenso wurde der Abfall der Signalstärke, also die Dissoziation von S100A4 von der Chipoberfläche detektiert, sobald die S100A4-Injektion gestoppt wurde und ausschließlich mit HBS-EP+-Puffer gespült wurde. Demzufolge findet eine Wechselwirkung zwischen S100A4 und sRAGE statt. Bei den angegebenen Daten und Graphen wurde das Hintergrundsignal, d. h. der Einfluss des HBS-EP+-Puffer auf die Messsignale berücksichtigt. Für die Auswertung der aufgenommenen Daten und die Berechnung der Kinetiken wurde die *Biacore*[®] T100 Evaluierungssoftware 2.0.1 verwendet. Die Messpunkte in den Sensorgrammen wurden unter Anwendung des Zwei-Stufen-Modells iterativ angepasst. Bei diesem Modell folgt nach der 1:1-Bindung der Interaktionspartner eine Konformationsänderung in einen stabileren Zustand.

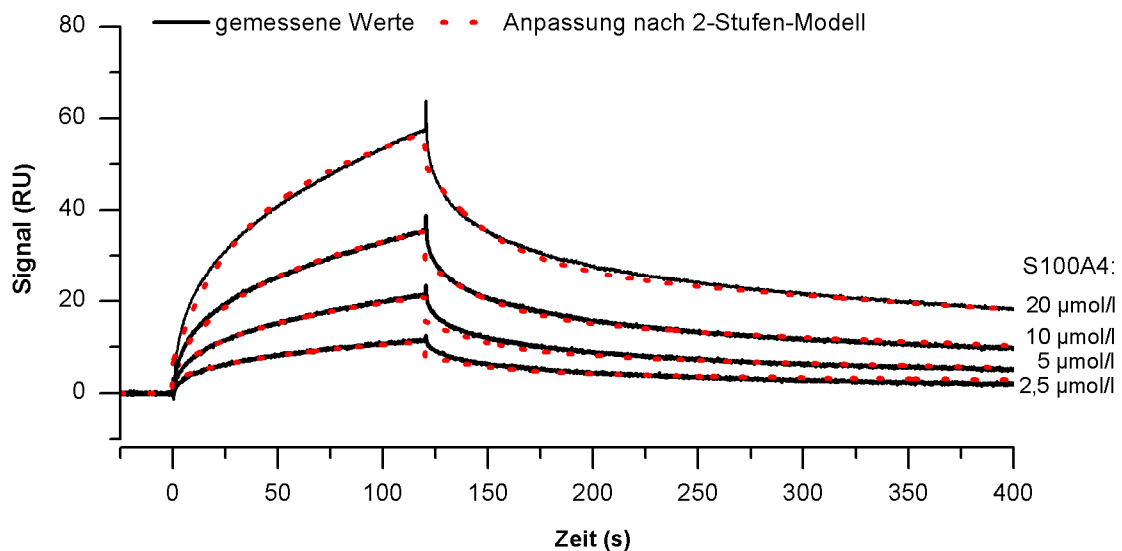


Abbildung 3-5: In-vitro-Bindung von S100A4 an immobilisiertem sRAGE [187]

Abgebildet sind die Sensorgramme von repräsentativen Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Bindungsmessungen an einem *Biacore*[®] T100-Gerät. Die Signalstärke wird in Resonanzeinheiten (RU) gemessen und ist proportional zur gebundenen Masse an der Chipoberfläche. Die durchgezogenen Linien zeigen die Bindung von S100A4 bei verschiedenen Konzentrationen (2,5-20 $\mu\text{mol/l}$) an das immobilisierte sRAGE-Protein in Abhängigkeit von der Zeit (s). Die iterativen Kurvenanpassungen nach Anwendung des Zwei-Stufen-Modells sind als rote Punkte dargestellt.

Die aus der Kurvenanpassung erhaltenen kinetischen Konstanten sind in **Tabelle 3-1** dargestellt. In sechs unabhängigen Messungen wurden Dissoziationskonstanten (K_D)

im Bereich zwischen $8,62 \times 10^{-7}$ M und $1,16 \times 10^{-5}$ M ermittelt. Dies deutet auf eine spezifische moderate Bindungsaffinität mit einem mittleren K_D -Wert von 27,8 μ M hin [187].

Tabelle 3-1: Nach dem Zwei-Stufen-Modell berechnete Reaktionsparameter für die S100A4-sRAGE-Bindung

In der Tabelle sind die mit Hilfe der iterativen Kurvenanpassung nach dem Zwei-Stufen-Modell erhaltenen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten der S100A4-Anlagerung (k_{a1} , k_{d1}) und der nachfolgenden Konformationsänderung (k_{a2} , k_{d2}) zusammengefasst. K_d : Dissoziationsgeschwindigkeits-, k_a : Assoziationsgeschwindigkeits-, K_D : Dissoziationskonstante.

Versuch	k_{a1} [M ⁻¹ ·s ⁻¹]	k_{d1} [s ⁻¹]	k_{a2} [s ⁻¹]	k_{d2} [s ⁻¹]	K_D [M]
1	$1,59 \times 10^4$	1,29	$9,48 \times 10^{-3}$	$4,44 \times 10^{-2}$	$6,68 \times 10^{-5}$
2	$5,84 \times 10^1$	$2,97 \times 10^{-2}$	$8,94 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-3}$	$8,33 \times 10^{-5}$
3	$1,09 \times 10^3$	$8,18 \times 10^{-3}$	$6,73 \times 10^{-3}$	$8,72 \times 10^{-4}$	$8,62 \times 10^{-7}$
4	$8,45 \times 10^2$	$1,28 \times 10^{-2}$	$7,29 \times 10^{-3}$	$6,83 \times 10^{-4}$	$1,30 \times 10^{-6}$
5	$4,69 \times 10^2$	$2,41 \times 10^{-2}$	$6,95 \times 10^{-3}$	$2,01 \times 10^{-3}$	$1,16 \times 10^{-5}$
6	$1,00 \times 10^3$	$1,44 \times 10^{-2}$	$5,10 \times 10^{-3}$	$1,38 \times 10^{-3}$	$3,06 \times 10^{-6}$
					$\varnothing 27,8 \times 10^{-6}$

3.3 Radiopharmakologische Charakterisierung des ¹⁸F-markierten S100A4-Proteins

3.3.1 ¹⁸F-Radiomarkierung

Die Radiomarkierung des humanen rekombinanten S100A4-Proteins mit N-Succinimidyl-4-[¹⁸F]Fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB) erfolgte *no carrier added* (n.c.a.) am N-terminalen Glycinrest bzw. an den Lysinseitenketten im S100A4-Protein (vgl. 2.5.2). Zur Minimierung der Anzahl verschiedener radiomarkierter S100A4-Spezies wurden die Reaktionsbedingungen bei einem pH-Wert < 8 gewählt, da bei diesem pH-Wert die Aminogruppen der Lysinseitenketten ($pK_s = 9,3-9,5$) nahezu vollständig protoniert vorliegen, so dass die [¹⁸F]Fluorbenzoylierung am N-terminalen Glycinrest des S100A4-Proteins stattfindet. Unter stark basischen Bedingungen ist die ϵ -Aminogruppe der Lysinseitenketten fast vollständig deprotoniert, wodurch die Konjugation mit [¹⁸F]SFB an diese Stelle bevorzugt wäre.

Abbildung 3-6 zeigt das angenommene Reaktionsschema der [¹⁸F]Fluorbenzoylierung an das S100A4-Protein. Unter den kalziumhaltigen Bedingungen der Radiomarkierung

(vgl. 2.5.2) liegt das S100A4-Protein als Dimer vor, wodurch die Kupplung von zwei [^{18}F]Fluorbenzoylresten möglich ist.

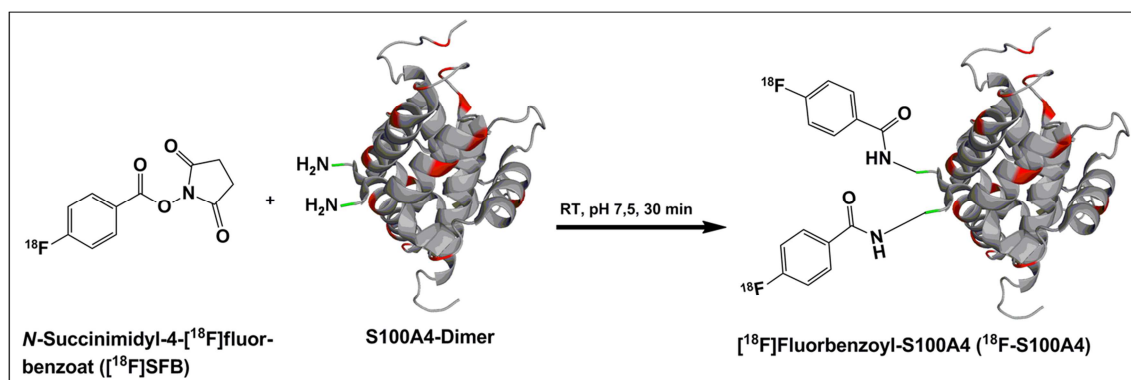


Abbildung 3-6: ^{18}F -Radiomarkierung des humanen rekombinanten S100A4-Proteins

Gezeigt ist das Reaktionsschema der ^{18}F -Fluorbenzoylierung an die N-Termini eines S100A4-Dimers. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur (RT) für 30 min und bei einem pH-Wert von ca. 7,5 durchgeführt. Im S100A4-Molekül sind die Lysinreste rot und der N-terminale Rest grün dargestellt.

Im Anschluss an die Radiomarkierung wurde das [^{18}F]Fluorbenzoyl-S100A4-Protein (^{18}F -S100A4) von radioaktiven niedermolekularen Nebenprodukten, wie z. B. nicht umgesetztem [^{18}F]SFB und [^{18}F]Fluorbenzoesäure mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Radiomarkierung und die nachfolgende Reinigung von ^{18}F -S100A4 konnte mit Hilfe einer Radio-SDS-PAGE sichtbar gemacht werden (**Abbildung 3-7**). Die Verteilung der radioaktiven Spezies im SDS-Gel wurde mittels Radioluminographie (**A**) bestimmt. Anschließend erfolgte die Färbung der Proteinbanden mit Coomassie-Blau (**B**). Spur 1 zeigt das für die Radiomarkierung eingesetzte rekombinante S100A4 Protein in PBS pH 7,3 (Originalansatz). Das S100A4-Monomer ist mit einer intensiven Proteinbande bei ca. 12 kDa (m) und das SDS-resistente Dimer bei ca. 24 kDa (n) zu sehen. Spur 2 zeigt das Reaktionsgemisch bestehend aus S100A4 und [^{18}F]SFB in PBS pH ~ 7,5. Außerdem sind noch weitere niedermolekulare radioaktive Substanzen sichtbar, die vermutlich nicht umgesetztem [^{18}F]SFB und [^{18}F]Fluorbenzoesäure zugeordnet werden können. Das Ergebnis der Reinigung des Reaktionsgemisches durch Größenausschlusschromatographie in Kalzium-Bindungspuffer ist in Spur 3 gezeigt. Es ist ersichtlich, dass die Intensität der S100A4-Dimerbande unter diesen Bedingungen zugenommen hat. In einer Western-Blot-Analyse (nicht gezeigt) wurde die S100A4-Spezifität der beiden Proteinbanden nachgewiesen. Die densitometrische Analyse der elektrophoretischen ^{18}F -S100A4-Monomer- und -Dimerbande im Radioluminogramm (A) ergab an den verschiedenen

Versuchstagen eine radiochemische Reinheit des gereinigten Präparates von $\geq 95\%$ (**Abbildung 3-7 A**: 58% Monomer-, 37% Dimerbande).

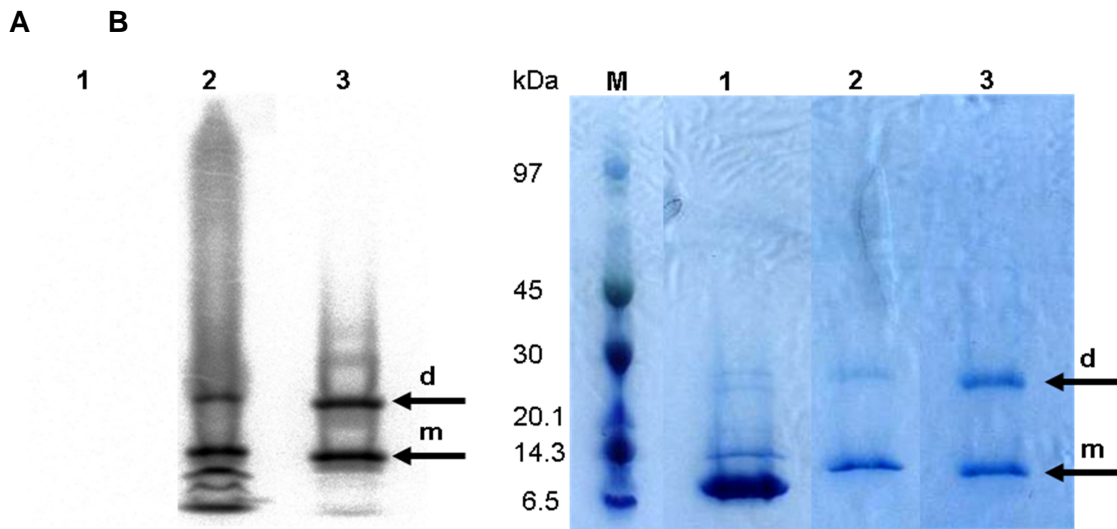


Abbildung 3-7: SDS-PAGE der ^{18}F -Radiomarkierung von S100A4 [187]

Gezeigt sind ein SDS-Polyacrylamid-Gradientengel als Radioluminogramm (**A**) und nach anschließender Färbung mit Coomassie-Brilliantblau (**B**) einer ^{18}F -Radiomarkierung von S100A4 zu ^{18}F -S100A4 und der anschließenden Reinigung. Spur 1: nicht-markiertes S100A4 (Originalansatz); Spur 2: Reaktionsgemisch [^{18}F]SFB + S100A4 in PBS; pH $\sim 7,5$; Spur 3: gereinigtes ^{18}F -S100A4-Präparat in Kalzium-Bindungspuffer. Die Pfeile markieren das S100A4-Protein als Monomer (m) und als SDS-resistentes Dimer (d). Spur M: Proteingrößenstandard

An den verschiedenen Versuchstagen wurde eine radiochemische Ausbeute an radioaktiv markiertem S100A4-Protein von 20-30% und eine effektive spezifische Aktivität von 2-3,4 GBq/ μmol erreicht.

3.3.2 In-vitro-Bindung an sRAGE

Die Untersuchung der In-vitro-Bindung von ^{18}F -S100A4 an RAGE erfolgte in 96-well-Platten mit immobilisiertem sRAGE, welcher die lösliche Form des Rezeptors darstellt und zur Bindung von Liganden fähig ist. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung von ^{18}F -S100A4 wurde dessen Bindung an Kavitäten mit BSA- bzw. Bicarbonat-/Carbonatpuffer-Beschichtung (bezeichnet als „Leer“) bestimmt (vgl. 2.5.4). An Kavitäten mit sRAGE-Beschichtung wurde eine spezifische Bindung von ^{18}F -S100A4 nachgewiesen. **Abbildung 3-8** zeigt die signifikante Zunahme von gebundenem ^{18}F -S100A4 an sRAGE um ca. 25% im Vergleich zur „Leer“-Kontrolle und um ca. 17% im Vergleich zur BSA-Kontrolle.

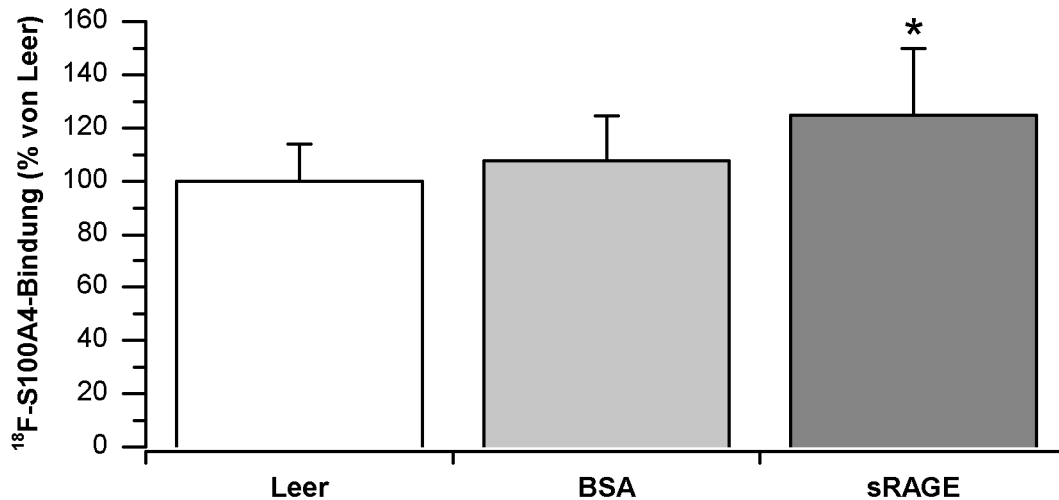


Abbildung 3-8: ¹⁸F-S100A4-Bindung an sRAGE [187]

Dargestellt ist die In-vitro-Bindung von ¹⁸F-S100A4 in 96-well-Platten mit immobilisiertem sRAGE bzw. BSA (jeweils 2,5 µg in Bicarbonat-/Carbonatpuffer) und an „Leer“-wells (Bicarbonat-/Carbonatpuffer). Gebundenes ¹⁸F-S100A4-Protein wurde mit einem Gamma-Radioaktivitätszähler bestimmt und prozentual zur Kontrolle dargestellt (Leer = 100%). (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 24, bei 3 unabhängigen Experimenten * p < 0,05 bezogen auf Leer und BSA).

3.3.3 Assoziation an Melanom- und Endothelzellen

Die Untersuchung der zellulären Assoziation von ¹⁸F-S100A4 erfolgte an A375-Melanomzellen sowie an Endothelzellen (HAEC) bei 4°C und 37°C, so dass zwischen Liganden-Bindung und möglicher energieabhängiger Liganden-Internalisierung differenziert werden kann (vgl. 2.5.5). Die A375-Zellen waren stabil mit dem hRAGE-pIRES2-AcGFP1-Vektor (A375-hRAGE) transfiziert worden (vgl. 2.6.4) und zeigten im Western Blot eine deutlich heraufregulierte RAGE-Proteinbiosynthese im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375- und den A375-mock-Zellen (**Abbildung 3-9**). Im Vergleich zu den Melanomzellen war die Synthese von RAGE-Protein bei den Endothelzellen (HAEC) deutlich geringer.

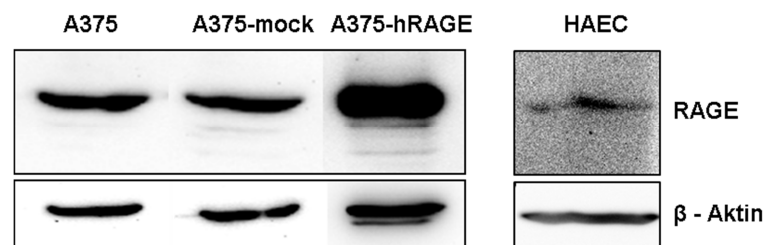


Abbildung 3-9: RAGE-Proteinnachweis bei HAEC-Endothel- und A375-Melanomzellen [187]

Gezeigt sind Western Blots nach Immundetektion von RAGE (oben) und β-Aktin (unten) als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinmengen im Gesamtzelllysate von HAEC-Endothel-, nicht-transfizierten A375-, A375-mock- und A375-hRAGE-Melanomzellen. Für den jeweiligen Proteinnachweis wurden spezifische Antikörper verwendet.

In **Abbildung 3-10** ist die Assoziation von ^{18}F -S100A4 an A375-, A375-mock und A375-hRAGE-Melanomzellen und an Endothelzellen dargestellt, nachdem die Zellen für 60 Minuten mit der ^{18}F -markierten Verbindung inkubiert worden waren.

A375-Melanomzellen

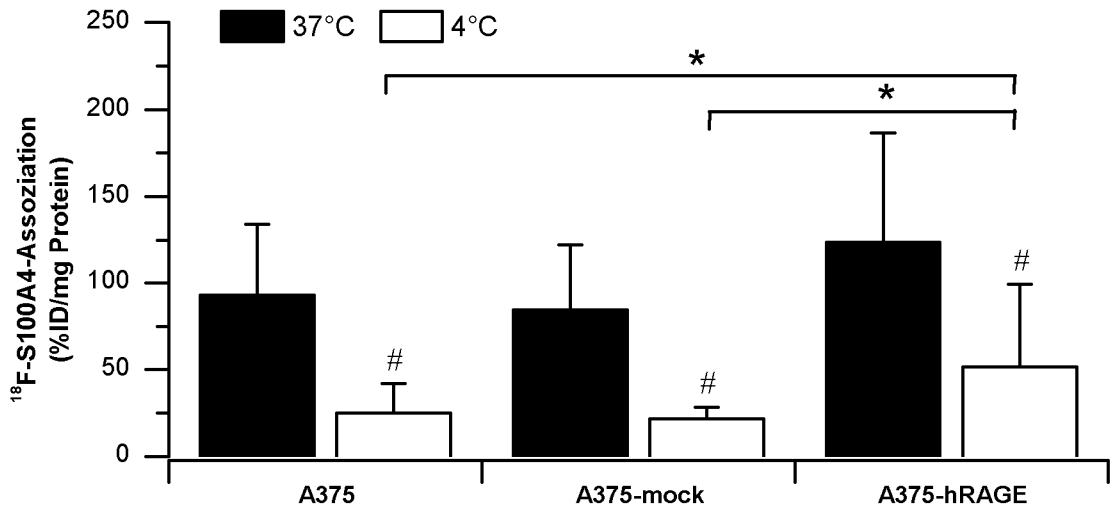
Für die Melanomzellen wurde bei 37°C eine deutlicher Tendenz hinsichtlich einer höheren Assoziation an die A375-hRAGE-Zellen festgestellt, die allerdings keine statistische Signifikanz zeigt (A375: 93 ± 41 % ID/mg Protein, A375-mock: 85 ± 38 % ID/mg Protein, A375-RAGE: 124 ± 63 % ID/mg Protein). Bei 4°C war die Assoziation von ^{18}F -S100A4 an A375-hRAGE-Zellen (51 ± 48 % ID/mg Protein) signifikant höher im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375- und den A375-mock-Zellen (25 ± 17 % ID/mg Protein und 22 ± 7 % ID/mg Protein).

HAEC-Endothelzellen

Die zelluläre Bindung von ^{18}F -markiertem S100A4 an die Endothelzellen war unter den gleichen Bedingungen deutlich höher als an die Melanomzellen (HAEC 37°C: 249 ± 87 % ID/mg Protein, 4°C: 64 ± 22 % ID/mg Protein). Zur Charakterisierung der Spezifität der ^{18}F -S100A4-Zellassoziation wurden Hemmexperimente mit nicht-radioaktivem S100A4 durchgeführt. Die vorherige Zugabe von rekombinantem S100A4 (ca. 200 $\mu\text{mol/l}$) führte zu einer signifikant geringeren Bindung an die Endothelzellen bei 37°C (110 ± 51 % ID/mg Protein). Diese spezifische Hemmung der Assoziation von ^{18}F -markiertem S100A4 an die Endothelzellen wurde bei 4°C nicht beobachtet (47 ± 20 % ID/mg Protein).

Insgesamt betrachtet war die Bindung des ^{18}F -markierten S100A4-Proteins an die Melanom- und die Endothelzellen bei 4°C signifikant geringer im Vergleich zur Zellbindung bei 37°C.

Melanomzellen



Endothelzellen

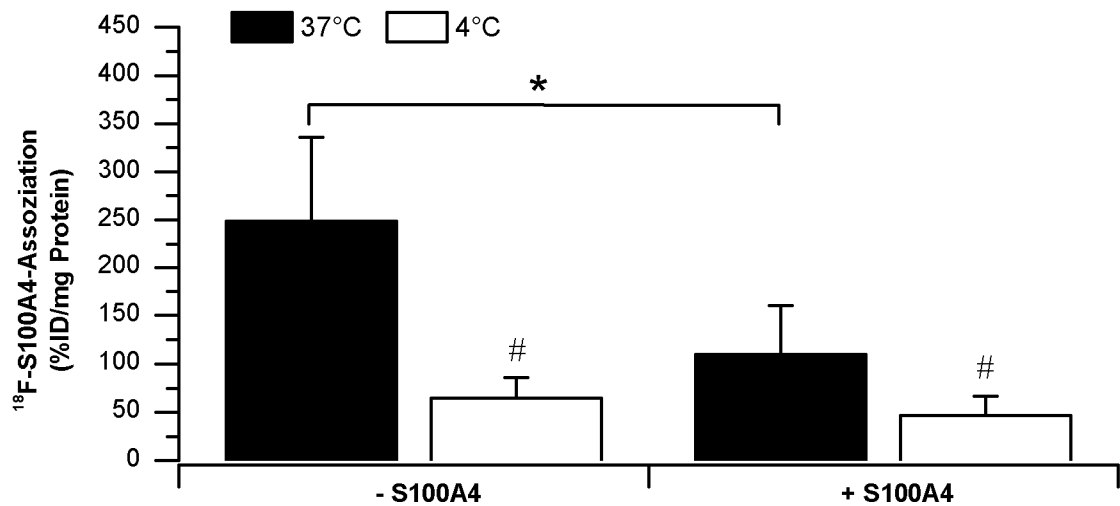


Abbildung 3-10: Untersuchungen zur zellulären Assoziation von ^{18}F -S100A4 [187]

Dargestellt ist die Assoziation von ^{18}F -S100A4 an A375-, A375-mock- und A375-hRAGE-Melanomzellen sowie an Endothelzellen nach 60 min bei 37°C und 4°C. Die Inkubation der Endothelzellen mit ^{18}F -S100A4 erfolgte in PBS (- S100A4) bzw. in Anwesenheit von nicht-markiertem S100A4 (ca. 200 $\mu\text{mol/l}$). Die Aktivität von gebundenem ^{18}F -S100A4 wurde im jeweiligen Gesamtzelllysat mit einem Gamma-Radioaktivitätszählgerätes bestimmt (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 12$ (A375) bzw. $n \geq 11$ (HAEC) bei 2-3 unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$ bezogen auf A375 und A375-mock bei 4°C bzw. auf HAEC bei vorheriger Zugabe von nicht-markiertem S100A4 bei 37°C, # $p < 0,05$ bezogen auf die Assoziation bei 37°C).

3.3.4 Stabilitätsuntersuchungen *in vivo*

Die Untersuchung der metabolischen Stabilität von ^{18}F -S100A4 erfolgte in einer Wistar-Ratte. Nach intravenöser Injektion von ^{18}F -S100A4 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (10, 30, 60 min) Blutproben entnommen (vgl. 2.5.6) und mittels Radio-

SDS-PAGE analysiert. (vgl. 2.5.3). Zu allen Zeitpunkten wurde ^{18}F -S100A4-Monomer und -Dimer im Blutplasma der Ratte detektiert (**Abbildung 3-11**). Die densitometrische Analyse der Proteinbanden ergab, dass nach 30 Minuten ca. 90% und nach 60 Minuten ca. 67% der Aktivität das ^{18}F -S100A4-Protein (Monomer und Dimer) aufwies. Nach 30 Minuten haben sich kleinere radioaktive Peptidmetaboliten (> 12 kDa) gebildet. Die densitometrische Auswertung ergab für diese beiden radioaktiven Peptide nach 30 Minuten eine Verteilung von 4% und 6% und nach 60 Minuten eine Verteilung von 20% und 13%. Demzufolge hat innerhalb dieser Zeit ein proteolytischer Abbau des ^{18}F -markierten S100A4-Proteins *in vivo* stattgefunden.

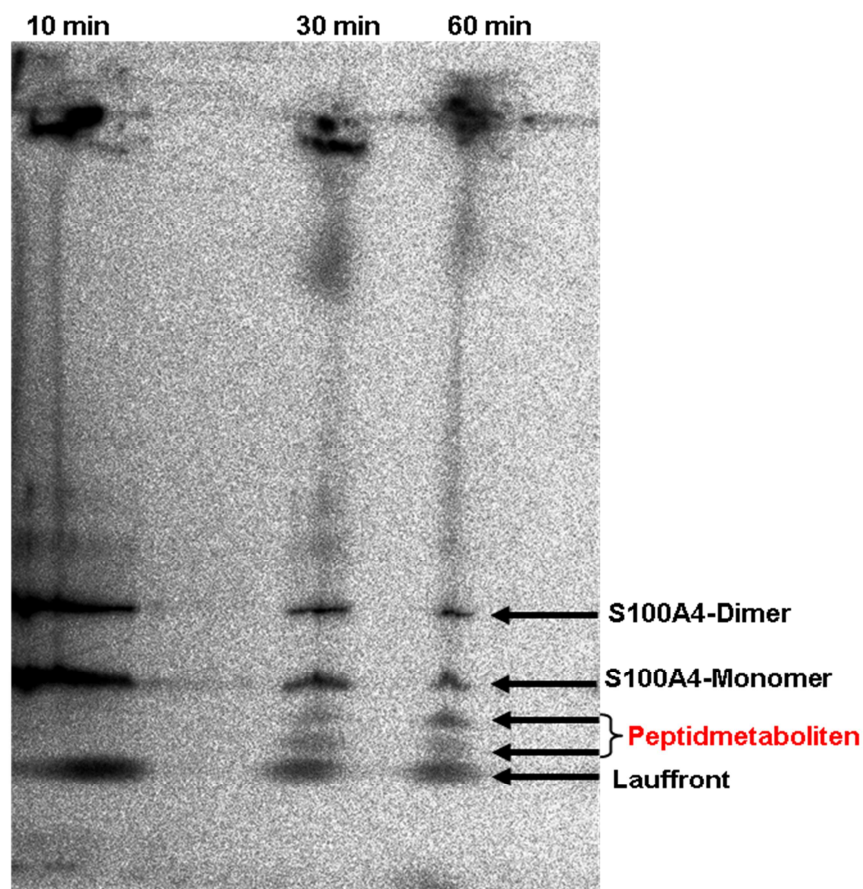


Abbildung 3-11: In-vivo-Stabilität von ^{18}F -S100A4 im Blutplasma einer Wistar-Ratte
Gezeigt ist ein repräsentatives SDS-Polyacrylamid-Gradientengel als Radioluminogramm mit Vollblutproben einer Ratte 10, 30 und 60 min nach intravenöser Injektion von ^{18}F -S100A4.

3.3.5 Bioverteilungsuntersuchungen in Ratten

Die Verteilung von ^{18}F -S100A4 in Geweben und Organen wurde 5 und 60 Minuten nach intravenöser Injektion in gesunden männlichen Wistar-Ratten untersucht (vgl. 2.5.8). Die Ergebnisse sind als Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe

(% ID/g Gewebe) in **Abbildung 3-12** dargestellt. Innerhalb der ersten 5 Minuten nach der Injektion wurde das ^{18}F -markierte S100A4 durch den Blutfluss in die einzelnen Organe der Ratte verteilt (Perfusionsphase). Nach dieser Zeit erfolgte eine sehr hohe Anreicherung von ^{18}F -S100A4 in den Nieren ($20 \pm 1,5\%$ ID/g). In weiteren Organen wie Milz, Leber, Blut, Lunge und den Nebennieren wurde eine Aktivitätsanreicherung mit Werten über 1% ID/g Gewebe nachgewiesen. In diesen Organen verringerte sich die Aktivität 60 Minuten nach der Injektion von ^{18}F -S100A4 auf Werte unter 1% ID/g Gewebe und nur in den Nieren wurden Werte $> 5\%$ ID/g Gewebe gemessen. Der Anteil von ^{18}F -markierten Verbindungen im zirkulierenden Blut betrug nach 5 Minuten $3 \pm 0,3\%$ und nach 60 Minuten $0,6 \pm 0,1\%$ der injizierten Dosis pro ml Blut. Bei einem Blutvolumen von ca. 6-10 ml in der Ratte entspricht dies 18-30% (5 Minuten) bzw. 4-6% (60 Minuten) der injizierten Dosis. Weiterhin wurde die Exkretion radioaktiver Substanzen im Urin der Ratten bestimmt. Die Aktivitätskonzentration von ^{18}F -S100A4 betrug 5 Minuten nach der Injektion $32 \pm 2\%$ der injizierten Dosis bzw. 60 Minuten nach der Injektion $70 \pm 7\%$ der injizierten Dosis.

In den bisher nicht erwähnten Organen war die Anreicherung radioaktiv markierter Substanzen dagegen vernachlässigbar gering. Bezüglich des Femurs (Oberschenkelknochen) ist die geringe Aktivität ein Indiz dafür, dass keine Defluorierung stattgefunden hat und es sich bei ^{18}F -S100A4 um eine stabile ^{18}F -Fluorbenzoyl-Amidbindung handelt.

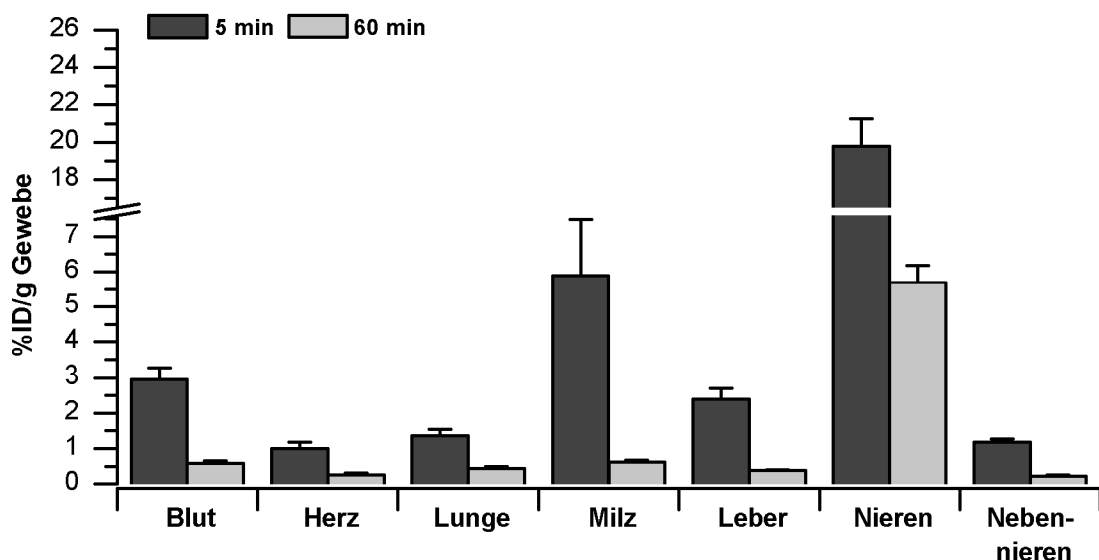


Abbildung 3-12: Bioverteilung von ^{18}F -S100A4 bei männlichen Wistar-Ratten [187]

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung als % ID/g Gewebe ausgewählter Organe 5 und 60 min nach intravenöser Injektion von ^{18}F -S100A4 in (jeweils $n = 4$).

3.3.6 PET-Untersuchungen

Zur weiteren In-vivo-Charakterisierung von ^{18}F -S100A4 wurde die zeitabhängige Verteilung und Anreicherung bei männlichen Wistar-Ratten mittels Kleintier-PET untersucht (vgl. 2.5.8). **Abbildung 3-13** zeigt eine repräsentative PET-Aufnahme als Maximum-Intensitäts-Projektion des Thorax-Abdominal-Bereiches einer Ratte über einem Zeitraum von 120 min nach einmaliger intravenöser Injektion von ^{18}F -S100A4. Die **Abbildung 3-13** zeigt eine deutliche Anreicherung radioaktiver Substanzen in den großen Blutgefäßen, im Bereich des Herzens sowie in den Nieren und den Harnleitern. Die Aktivität im Herz spiegelt die Anreicherung radioaktiver Substanzen im kardialen Blutpool (Herzkammern) wieder, da Bioverteilungs-Untersuchungen von ^{18}F -S100A4 in Ratten ergaben nur eine sehr geringe Konzentration radioaktiver Substanzen im Herzmuskel (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden Anreicherungen ^{18}F -markierter Substanzen im Bereich von Lunge, Leber und Milz beobachtet.

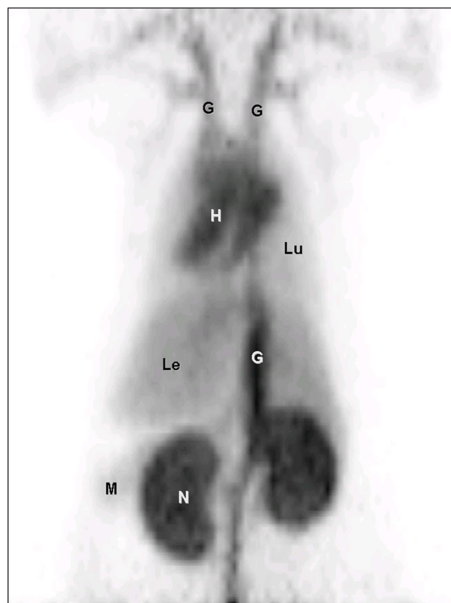


Abbildung 3-13: Kleintier-PET-Untersuchung mit ^{18}F -S100A4 [187]

Dargestellt ist die Maximum-Intensitäts-Projektion über einen Zeitraum von 0-120 min nach intravenöser Injektion von ^{18}F -S100A4 in eine männliche Wistar-Ratte. (Die Grautöne kennzeichnen die Aktivitätskonzentration in Bq/cm^3 : weiß < grau < schwarz; G: Gefäße; H: Herz; Lu: Lunge; Le: Leber; M: Milz; N: Nieren).

Der zeitliche Verlauf der Aktivitätsverteilung von ^{18}F -S100A4 in einer männlichen Wistar-Ratte ist in repräsentativen Bildern in **Abbildung 3-14 A** zusammengefasst. In den ersten 10 Minuten nach der Injektion wurde die Verteilung radioaktiver Substanzen über das Blutgefäßsystem und im Herzbereich beobachtet. Bereits im Zeitraum von

2-10 Minuten wurde in den Nieren eine deutliche Aktivitätsanreicherung festgestellt, welche auch nach 120 Minuten noch deutlich nachweisbar war. Weiterhin wurde in diesem Zeitintervall Aktivität in der Leber-, Milz- und Lungenregion detektiert.

Für eine detailgetreuere Darstellung wurden aus den PET-Datensätzen repräsentative Bilder von drei tomographischen Schnittebenen (transversal, sagittal, koronar) erzeugt (**Abbildung 3-14 B**). In der Transversalebene ist Aktivität in der Leber zu sehen. Die koronare Schnittebene zeigt deutlich, dass die Hauptanreicherung radioaktiver Substanzen in der Niere im Nierenkortex stattgefunden hat. Weiterhin wird ersichtlich, dass sich in der Magenregion keine Aktivität angereichert hat. In der sagittalen Ebene wurde eine Akkumulation der Aktivität im Herz, in der Lunge und in der Leber beobachtet.

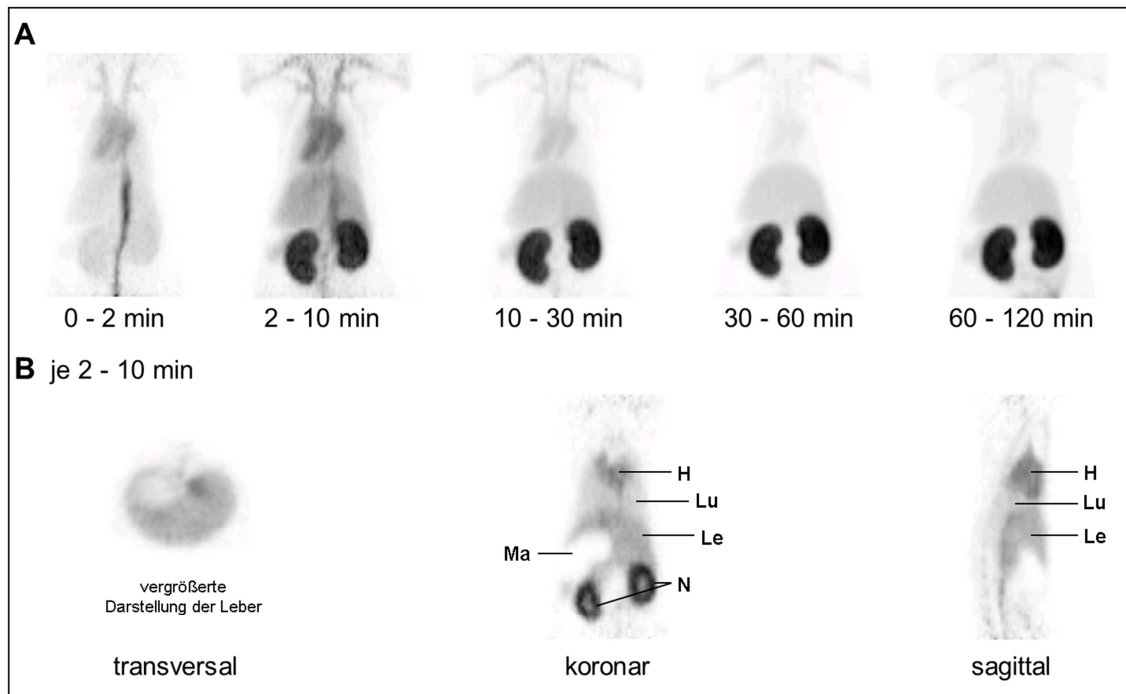


Abbildung 3-14: Kleintier-PET-Untersuchungen mit ^{18}F -S100A4

(A) Dargestellt sind repräsentative serielle Maximum-Intensitäts-Projektionen von 0-2 min, 2-10 min, 10-30 min, 30-60 min und 60-120 min nach intravenöser Injektion von ^{18}F -S100A4 in männlichen Wistar-Ratten. (B) Gezeigt sind repräsentative Bilder von drei tomographischen Schnittebenen (transversal, koronar und sagittal) aus Maximum-Intensitäts-Projektionen der Summenbilder 2-10 min nach intravenöser Injektion von ^{18}F -S100A4. (Die Graustufen kennzeichnen die Aktivitätskonzentration in Bq/cm³: weiß < grau < schwarz; H: Herz; Lu: Lunge; Le: Leber; Ma: Magen; N: Nieren).

Zur Ermittlung der Kinetik von ^{18}F -S100A4 wurden für ausgewählte Organe aus den PET-Datensätzen Zeit-Aktivitäts-Kurven berechnet (**Abbildung 3-15 A**). Die Darstellung der Konzentration radioaktiver Substanzen als Prozent des Maximums gibt Aufschluss über die quantitative zeitabhängige In-vivo-Aufnahme von ^{18}F -S100A4 in

Herz, Lunge und Niere und erlaubt somit den Vergleich der ^{18}F -S100A4-Kinetik in diesen Organen.

Die Zeit-Aktivitätskurve der Herzregion repräsentiert die Verweildauer von ^{18}F -S100A4 im zirkulierenden Blut. Nach intravenöser Injektion der radioaktiven Substanz zeigt sich ein sehr schneller Anstieg der Aktivität im Blutpool (Maximum bei 95 s, arterieller Input) und einer anschließenden Eliminierung von ^{18}F -S100A4, so dass nach 35 Minuten (2.100 s) noch ca. 16%, nach 65 Minuten (3.900 s) noch ca. 10% und nach 115 Minuten (6.900 s) noch ca. 6% von ^{18}F -S100A4 im Blut verblieben sind. Allerdings konnte trotz dieser schnellen Verteilungs- und Gewebeassoziationsphase ($t^{1/2d/a} = 0,5 \pm 0,1$ min) eine beachtliche Menge an ^{18}F -S100A4 im zirkulierenden Blut detektiert werden (Eliminierungs-Halbwertszeit: $t^{1/2e} = 57 \pm 10$ min).

In der Lunge wurde nach der Injektion von ^{18}F -S100A4 eine ebenso schnelle Anreicherung der radioaktiven Substanz wie im Blutpool beobachtet (Maximum bei 105 s). Die darauffolgende Eliminierung von ^{18}F -S100A4 aus der Lunge verlief jedoch langsamer als aus dem Blut, so dass nach 35 Minuten (2.100 s) noch ca. 27%, nach 65 Minuten (3.900 s) noch ca. 18% und nach 115 Minuten (6.900 s) noch ca. 10% der Aktivität im Lungengewebe vorhanden waren. Die Berechnung des Lunge-zu-Blut-Verhältnisses zeigt nach 85 Minuten (5.100 s) den maximalen Wert von 1,73 welcher bis zum Ende der Messung (6.900 s) annähernd konstant bleibt (1,72) und eine ca. 1,7-fach höhere ^{18}F -Aktivität in der Lunge im Vergleich zum Blutpool wiedergibt (**Abbildung 3-15 B**). Dies weist auf eine Interaktion von ^{18}F -S100A4 mit spezifischen Rezeptoren der Lungenzellen hin. Aufgrund des hohen basalen Vorkommens von RAGE in der Lunge ist diese als Referenzorgan für die Synthese von RAGE anzusehen.

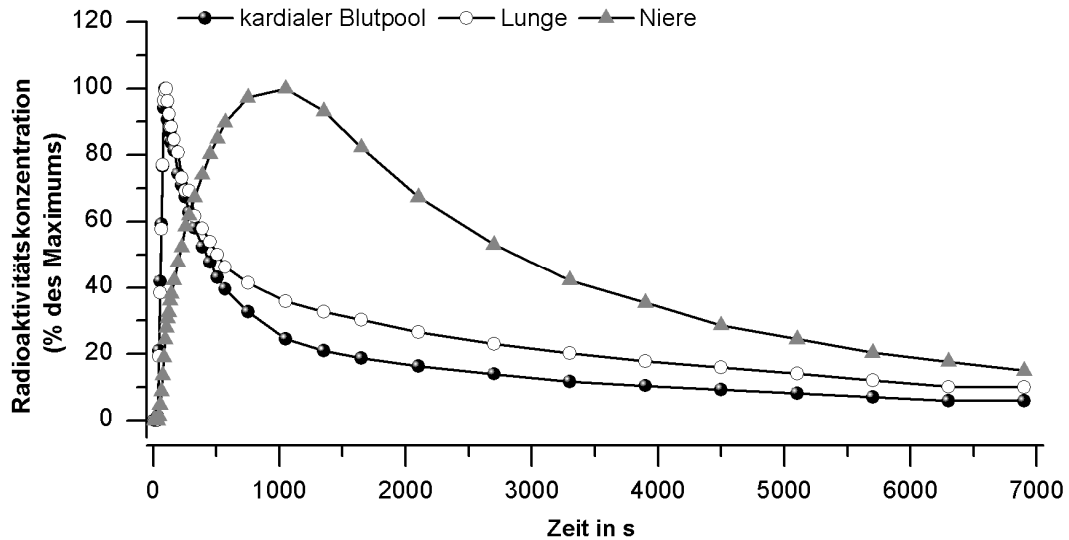
Die rasche Eliminierung von ^{18}F -S100A4 aus dem Blut und der Lunge der Ratte ging mit der Akkumulation der radioaktiven Substanzen in den Nieren einher (**Abbildung 3-15 A**). Nach 17,5 Minuten (1.050 s) war die maximale Anreicherung von ^{18}F -S100A4 in den Nieren erreicht und daraufhin allmählich abnahm. Die Ausscheidung von ^{18}F -S100A4 über die Nieren verlief viel langsamer als aus dem Blut und der Lunge. Es konnten nach 35 Minuten (2.100 s) noch ca. 67%, nach 65 Minuten (3.900 s) noch ca. 35% und nach 115 Minuten (6.900 s) noch ca. 15% ^{18}F -markiertes S100A4 in der Niere gemessen werden.

Hemmung mit glykLDL

Des Weiteren wurden PET-Untersuchungen mit glykiertem LDL (glykLDL), einem hoch affinen Liganden für RAGE, durchgeführt, wobei 2 μM glykLDL zusammen mit

^{18}F -S100A4 in die Ratte injiziert wurde. Dabei wurde nach ungefähr 12,5 Minuten (750 s) bis zum Ende der Messung eine signifikante Verminderung des Lunge-zu-Blut-Verhältnisses um $27 \pm 4\%$ beobachtet (**Abbildung 3-15 B**). Demnach findet durch glykLDL eine effiziente Verdrängung von ^{18}F -S100A4 von potenziellen Bindungsstellen in der Lunge statt.

A



B

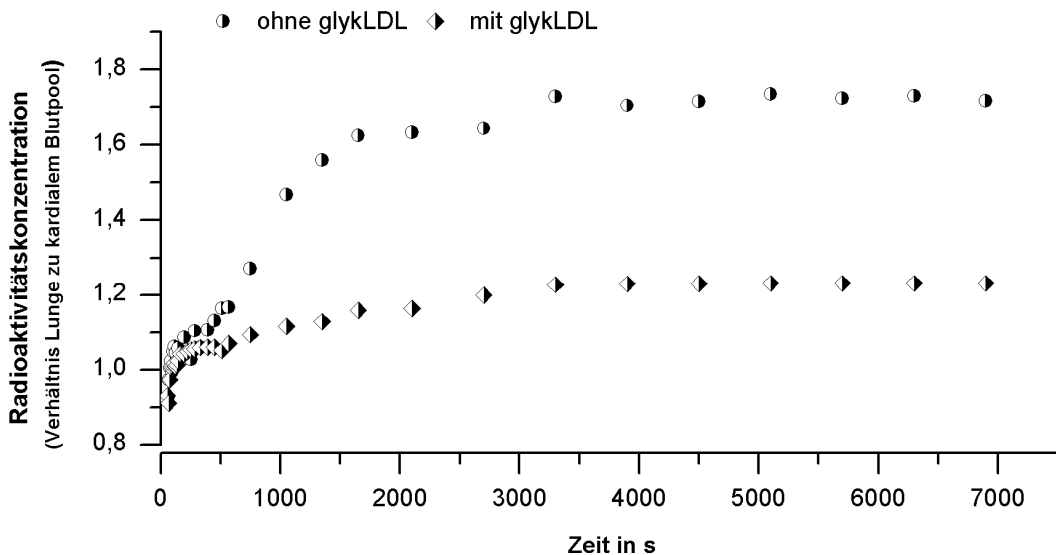


Abbildung 3-15: In-vivo-Kinetik von ^{18}F -S100A4 in Herz, Lunge und Niere [187]

(A) Gezeigt sind repräsentative Zeit-Aktivitätskurven, die den zeitlichen Verlauf der ^{18}F -markierten Verbindung als % des Maximums über einen Zeitraum von 0-120 min nach einmaliger intravenöser Injektion von ^{18}F -S100A4 in männlichen Wistar-Ratten wiedergeben. (B) Dargestellt ist die Konzentration radioaktiver Substanzen als Verhältnis Lunge zu kardialen Blutpool über einen Zeitraum von 0-120 min nach einmaliger intravenöser Injektion von ^{18}F -S100A4 in Ratten mit (Diamanten, Blockierungsgruppe $n = 3$) bzw. ohne (Kreise) $2 \mu\text{M}$ glykLDL ($n = 3$).

Für weiterführende Untersuchungen der S100A4-RAGE-Interaktion an Ratten- und tumortragenden Mausmodellen, die nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren, wurde zunächst das Vorkommen von S100A4 und RAGE in verschiedenen Melanomzellen analysiert.

3.4 Untersuchungen zum Vorkommen von S100A4 und RAGE in Melanomzellen

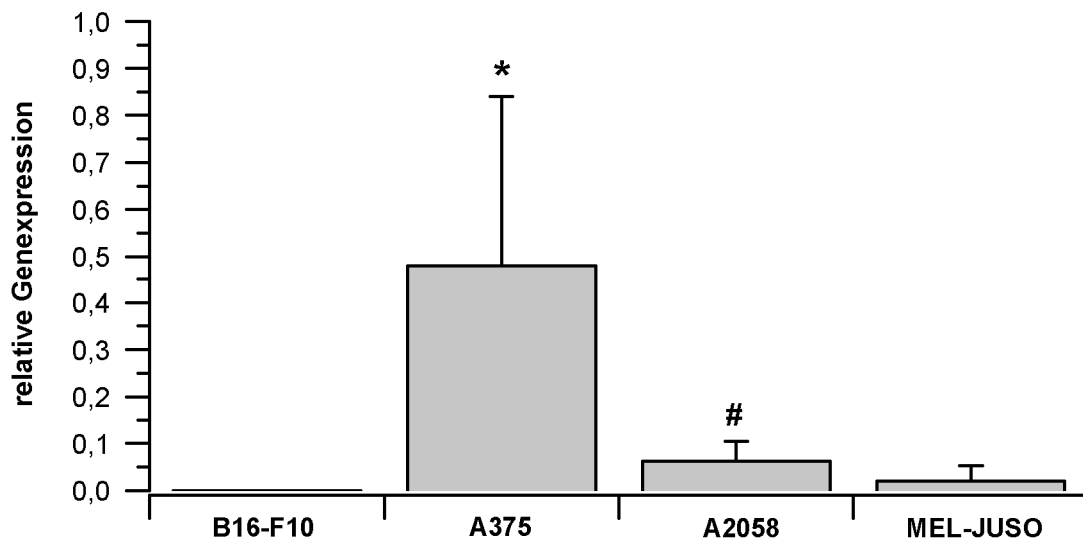
Für die zelluläre Charakterisierung der S100A4-RAGE-Interaktion wurde zunächst die Genexpression und die Proteinbiosynthese von S100A4 und RAGE in Melanomzellen aus Primärtumoren und Metastasen bestimmt.

Zur relativen mRNA-Quantifizierung von S100A4 und RAGE wurde eine quantitative Echtzeit-RT-PCR durchgeführt (vgl. 2.2.13). Nach Auswertung der Fluoreszenzsignale und des Schwellenwertzyklus (C_t -Wert) wurde jede Probe relativ auf die Expression des Haushaltsgens β -Aktin bezogen.

Bei allen untersuchten Melanomzellen konnten S100A4- und RAGE-mRNA nachgewiesen werden. Die einzelnen Zelllinien zeigten unterschiedliche Expressionsniveaus, wobei generell festgestellt wurde, dass die S100A4-Expression deutlich, d. h. um ca. drei Größenordnungen über dem RAGE-Expressionsniveau liegt (**Abbildung 3-16**). Die humane Melanomzelllinie A375 weist gegenüber allen anderen Zellen die signifikant höchste S100A4-mRNA-Expression auf. Zudem zeigen die A375- und A2058-Zellen eine signifikant höhere S100A4-Genexpression gegenüber der Melanomzelllinie MEL-JUSO aus einem Primärtumor.

RAGE wurde ebenfalls bei den humanen Melanomzellen (A375, A2058, MEL-JUSO) nachgewiesen, aber signifikante Unterschiede waren nur zwischen den A2058- und den MEL-JUSO-Zellen feststellbar. Die S100A4- und RAGE-Genexpression konnte ebenso für die murine Melanomzelllinie B16-F10 gezeigt werden, jedoch exprimiert diese Zelllinie die beiden Gene im weitaus geringeren Maße als die humanen Melanomzellen.

S100A4



RAGE

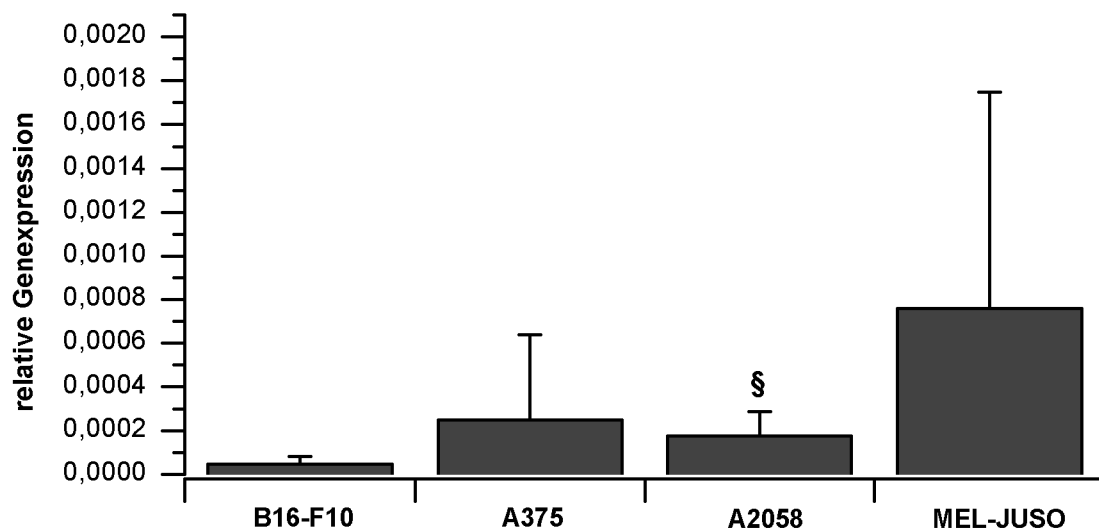


Abbildung 3-16: Genexpression von S100A4 und RAGE bei verschiedenen Melanomzellen

Dargestellt ist die mRNA-Expression von S100A4 und RAGE relativ zu β -Aktin bei den Zelllinien B16-F10, A375, A2058 und MEL-JUSO. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 6$ (S100A4), $n \geq 9$ (RAGE) bei je 3-4 unabhängigen Proben, * $p < 0,05$ bezogen auf A2058 bzw. MEL-JUSO, # $p < 0,05$ bezogen auf A375 bzw. MEL-JUSO, § $p < 0,05$ bezogen auf MEL-JUSO; relative mRNA-Expression = $2^{-\Delta C_t}$, $\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Haushaltsgen } \beta\text{-Aktin})$)

Der Proteinnachweis von S100A4 und RAGE erfolgte im Gesamtzelllysat der Melanomzellen unter Durchführung einer SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern (vgl. 2.3.8). **Abbildung 3-17** zeigt repräsentative Bilder der S100A4- und RAGE-Proteinbiosynthese mit spezifischen Signalen für S100A4 bei

ca. 11 kDa und RAGE bei ca. 55 kDa. Zur Kontrolle des Auftrags gleicher Proteinmengen wurde β -Aktin bei 42 kDa detektiert und wurde in allen Zelllinien mit etwa gleichen Signalstärken nachgewiesen. Eine deutliche S100A4-Proteinbande wurde in A375- und A2058-Zellen beobachtet, während bei MEL-JUSO-Zellen nur eine äußerst schwache und bei B16-F10-Zellen keine S100A4-Proteinbiosynthese detektiert wurde. Im Bezug auf RAGE wurden bei allen Melanomzelllinien deutliche Proteinbanden nachgewiesen. Außerdem detektierte der RAGE-Antikörper noch kleinere Proteinsignale, die vermutlich verschiedene Glykosilierungszustände von RAGE und/oder RAGE-Isoformen darstellen [147].

Insgesamt ist anzumerken, dass der gezeigte Proteinnachweis von S100A4 und RAGE erst nach Verstärkung des Chemilumineszenzsignals möglich wurde, so dass von einer geringeren S100A4- und RAGE-Proteinbiosynthese in den Zellen ausgegangen werden muss.

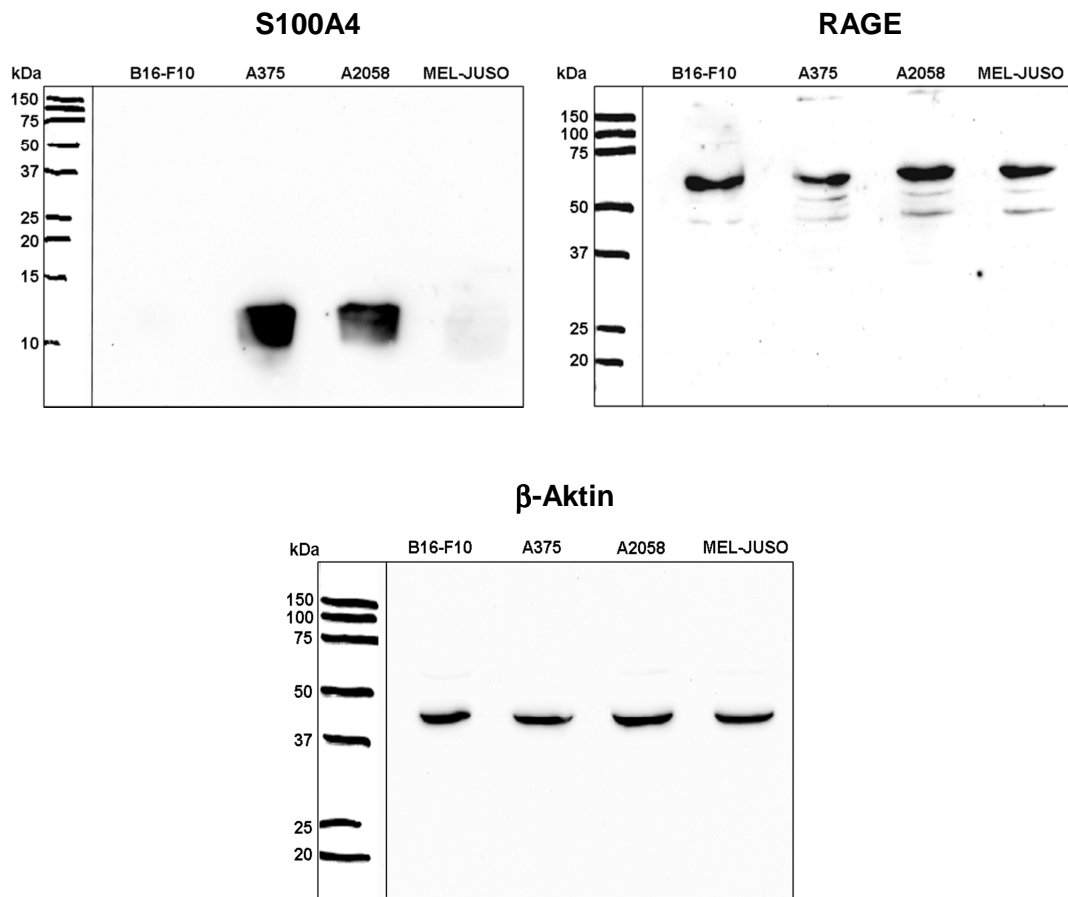


Abbildung 3-17: Proteinnachweis von S100A4 und RAGE in Melanomzellen

Gezeigt sind Western Blots nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen S100A4 (11 kDa), RAGE (55 kDa) und β -Aktin (42 kDa) als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinmengen im Gesamtzelllysate von humanen (A375, A2058, MEL-JUSO) und murinen (B16-F10) Melanomzellen. Die Proteinbanden für S100A4 und RAGE wurden erst nach Verstärkung des Chemilumineszenzsignals detektiert (vgl. 2.3.8.)

Zur Untersuchung des Einflusses von S100A4 an Prozessen der Metastasierungskaskade wurden stabil mit S100A4-transfizierte A375-Melanomzellen generiert und der Einfluss der heraufregulierten S100A4-Proteinbiosynthese auf zelluläre Eigenschaften der Tumorprogression wie Proliferation, Motilität, Adhäsion, Migration und Invasion untersucht. Des Weiteren wurde die S100A4-Sekretion dieser Zellen nachgewiesen und die Bedeutung des extrazellulären S100A4-Proteins hinsichtlich der Aktivierung von NF- κ B und RAGE geklärt. Abschließend erfolgten In-vivo-Untersuchungen der stabil transfizierten A375-Zellen bei Nacktmäusen.

3.5 Generierung von stabil mit S100A4-transfizierten Melanomzellen

3.5.1 Klonierung des humanen und murinen S100A4-Gens in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1

Für die Generierung von stabil mit S100A4-transfizierten Melanomzellen war die Klonierung des humanen und murinen S100A4-Gens in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1 erforderlich (**Abbildung 3-18 A**).

Die kodierende cDNA für das humane S100A4-Gen (vgl. 3.1.1) wurde in einer PCR-Reaktion unter Verwendung der Primer hS100A4-PstI und hS100A4-BamHI (vgl. **Tabelle 2-2**) amplifiziert. Dadurch wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym PstI am 5'-Ende sowie für das BamHI-Enzym am 3'-Ende der S100A4-cDNA angefügt. Die Analyse des PCR-Produktes mittels Agarose-Gelelektrophorese zeigte die erwartete Länge von 334 bp (**Abbildung 3-18 B**). Das S100A4-PCR-Produkt mit den eingefügten Schnittstellen wurde mit Hilfe des *TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing* in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor eingefügt (**Abbildung 3-18 C**) und in *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert. Nach Vermehrung und Plasmidpräparation des rekombinanten Vektors erfolgte die Überprüfung der korrekten Ligation mit einer Kolonie-PCR unter Verwendung von S100A4-spezifischen Primern (vgl. **Tabelle 2-2**). In allen fünf Kolonien konnte das native S100A4-Fragment mit einer Länge von 209 bp nachgewiesen werden (**Abbildung 3-18 D**).

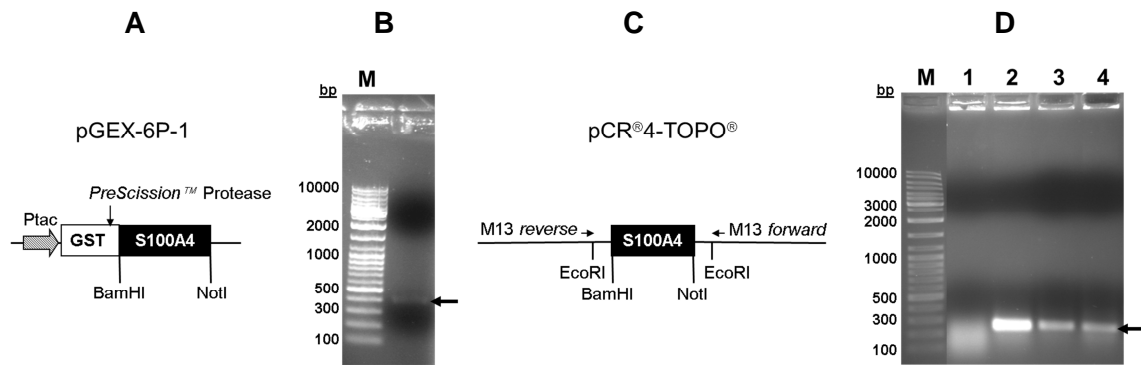


Abbildung 3-18: Klonierung des humanen S100A4-Gens in den Vektor pIRES2-AcGFP1: Vorgehen und Ergebnisse

Schematische Darstellung des S100A4-Gens im pIRES2-AcGFP1-Vektor. **(B)** 1,5%iges Agarose-Gel nach Ethidiumbromid-Färbung zeigt das gereinigte S100A4-PCR-Produkt mit den eingefügten BamHI- und PstI-Schnittstellen (334 bp, Pfeil). **(C)** Schematische Darstellung des S100A4-Gens im pCR®4-TOPO®-Vektor. Eingezeichnet sind die Sequenzierungsprimer M13 reverse und M13 forward sowie die Restriktionschnittstellen im Ausgangsvektor (EcoRI) und in der klonierten S100A4-cDNA. **(D)** Die Ligation der klonierten S100A4-cDNA und pCR®4-TOPO® und die Transformation in *E. coli*-TOP10-Zellen wurde mit einer Kolonie-PCR überprüft. Das 1,5%ige Agarose-Gel nach Ethidiumbromid-Färbung zeigt in den Spuren 2, 3 und 4 die korrekte Länge der nativen S100A4-cDNA von 209 bp (Pfeil). Spur M: DNA-Größenmarker

Im nächsten Schritt erfolgte die Linearisierung der Plasmide pIRES2-AcGFP1 und pCR®4-TOPO®-S100A4 mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI. Die Reaktionsansätze wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt, um die Fragmente mit BamHI- und PstI-Überhängen (sogenannte *sticky ends*) zu extrahieren. Der pIRES2-AcGFP1-Vektor zeigte die erwartete Länge bei 5285 bp (**Abbildung 3-19 A**) und das S100A4-Fragment bei 319 bp (**Abbildung 3-19 B**, Pfeil). Die gereinigten Fragmente wurden anschließend miteinander ligiert und in *E. coli*-DH5α-Zellen transformiert. Der Erfolg der Ligation wurde mit einer Kolonie-PCR unter Verwendung der S100A4-spezifischen Primer überprüft (vgl. **Tabelle 2-2**). Im Agarosegel wiesen alle Kolonien das native S100A4-Fragment mit einer Länge von 209 bp auf (**Abbildung 3-19 C**). Vier Kolonien wurden in entsprechendem Selektionsmedium vermehrt, deren Plasmid-DNA isoliert und einer Restriktionshydrolyse mit den Enzymen BamHI und PstI unterzogen. Mittels Gelelektrophorese wurde das korrekte S100A4-Fragment mit einer Länge von 319 bp nachgewiesen (**Abbildung 3-19 D**, Pfeil).

Nachdem die Sequenz des Expressionsvektors pIRES2-AcGFP1-S100A4 mit einer Sequenzieranalyse⁴ überprüft wurde, konnte dieser nun für die stabile Transfektion der humanen A375-Melanomzellen verwendet werden.

⁴ Die Sequenzierung der klonierten Plasmid-Vektoren erfolgte durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) mit firmeneigenen Vektor-spezifischen Primern.

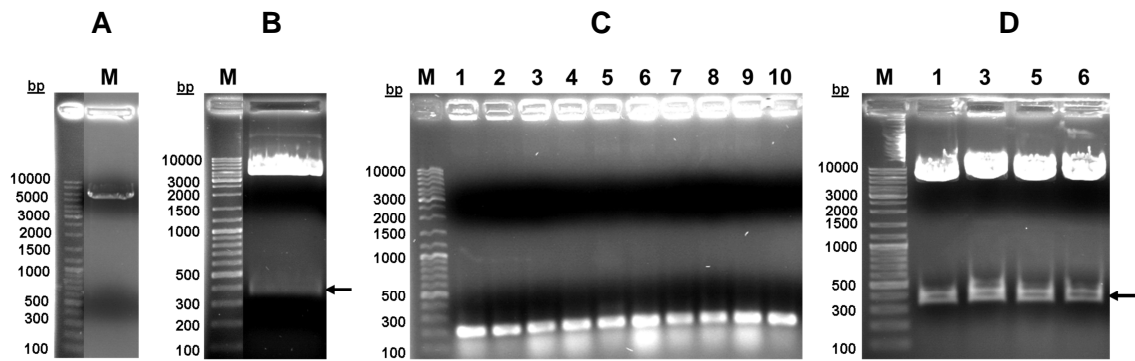


Abbildung 3-19: Ergebnisse der Klonierung von humanem S100A4 in den Vektor pIRES2-AcGFP1
Gezeigt sind gelelektrophoretisch getrennte Agarosegele nach der Ethidiumbromid-Färbung. **(A)** Restriktionshydrolyse von pIRES2-AcGFP1 mit BamHI und PstI. **(B)** Restriktionshydrolyse von pCR[®]4-TOPO[®]-S100A4 mit BamHI und PstI. **(C)** Zur Überprüfung der Ligation von S100A4 und pIRES2-AcGFP1 wurde eine Kolonie-PCR mit den S100A4-spezifischen Primern durchgeführt. Gezeigt sind die PCR-Produkte von 10 Kolonien. **(D)** Von den Kolonien 1, 3, 5 und 6 wurde die Plasmid-DNA isoliert und eine Restriktionshydrolyse mit BamHI und PstI durchgeführt. Der Pfeil zeigt das korrekte S100A4-Fragment mit den eingefügten Schnittstellen von 319 bp. Spur M: DNA-Größenmarker

Für die Klonierung des murinen S100A4-Gens in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1 wurde die kodierende cDNA aus der RNA von B16-F10-Zellen mittels reverser Transkription und PCR (RT-PCR) amplifiziert. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde das gereinigte PCR-Produkt mit der Primerkombination mS100A4-PstI und mS100A4-BamHI (vgl. **Tabelle 2-2**) amplifiziert, so dass am 5'-Ende der cDNA eine PstI- und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle angefügt wurde. Die weitere Vorgehensweise entsprach der Klonierung des humanen S100A4-Gens in den pIRES2-AcGFP1-Vektor.

3.5.2 Nachweis der stabilen Transfektion von A375-Melanomzellen

Die Transfektion der humanen A375-Melanomzellen mit den Plasmiden hS100A4- und mS100A4-pIRES2-AcGFP1 sowie die nachfolgende Selektion mit dem Antibiotikum G418 führte zur Etablierung der stabil transfizierten Zelllinien A375-hS100A4 und A375-mS100A4 (vgl. 2.6.4). Um sicherzugehen, dass nicht der Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1 per se zu einer erhöhten S100A4-Proteinbiosynthese bei den A375-Melanomzellen führt, wurden ebenso Zelllinien generiert, die stabil mit dem nativen pIRES2-AcGFP1-Vektor transfiziert waren und als A375-mock bezeichnet.

Der Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1 verfügt über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES-Sequenz), wodurch in den transfizierten Zellen das S100A4-Gen und das grün fluoreszierende AcGFP1-Gen als Einzelproteine von einer bicistronischen mRNA translatiert werden. Die stabil transfizierten Zell-Kolonien konnten damit anhand ihrer AcGFP1-Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert und isoliert werden (**Abbildung 3-20 A**).

Des Weiteren ermöglichte die Grünfluoreszenz die durchflusszytometrische Sortierung der transfizierten Zellen (vgl. 2.6.5), wodurch Zellpopulationen mit über 90% AcGFP1-positiven Zellen etabliert wurden (**Abbildung 3-20 B**). Um zu überprüfen, ob die stabil-transfizierten A375-hS100A4- und A375-mS100A4-Zelllinien tatsächlich eine höhere S100A4-Proteinbiosynthese im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375- und den A375-mock-Zellen zeigen, wurde S100A4 mittels Western Blot und anschließender Immundetektion nachgewiesen (**Abbildung 3-20 C**). Die starken Proteinbanden der A375-hS100A4- und A375-mS100A4-Zellen verdeutlichen die Heraufregulierung der humanen und murinen S100A4-Proteinbiosynthese im Vergleich zu den A375-mock- und den nicht-transfizierten A375-Zellen.

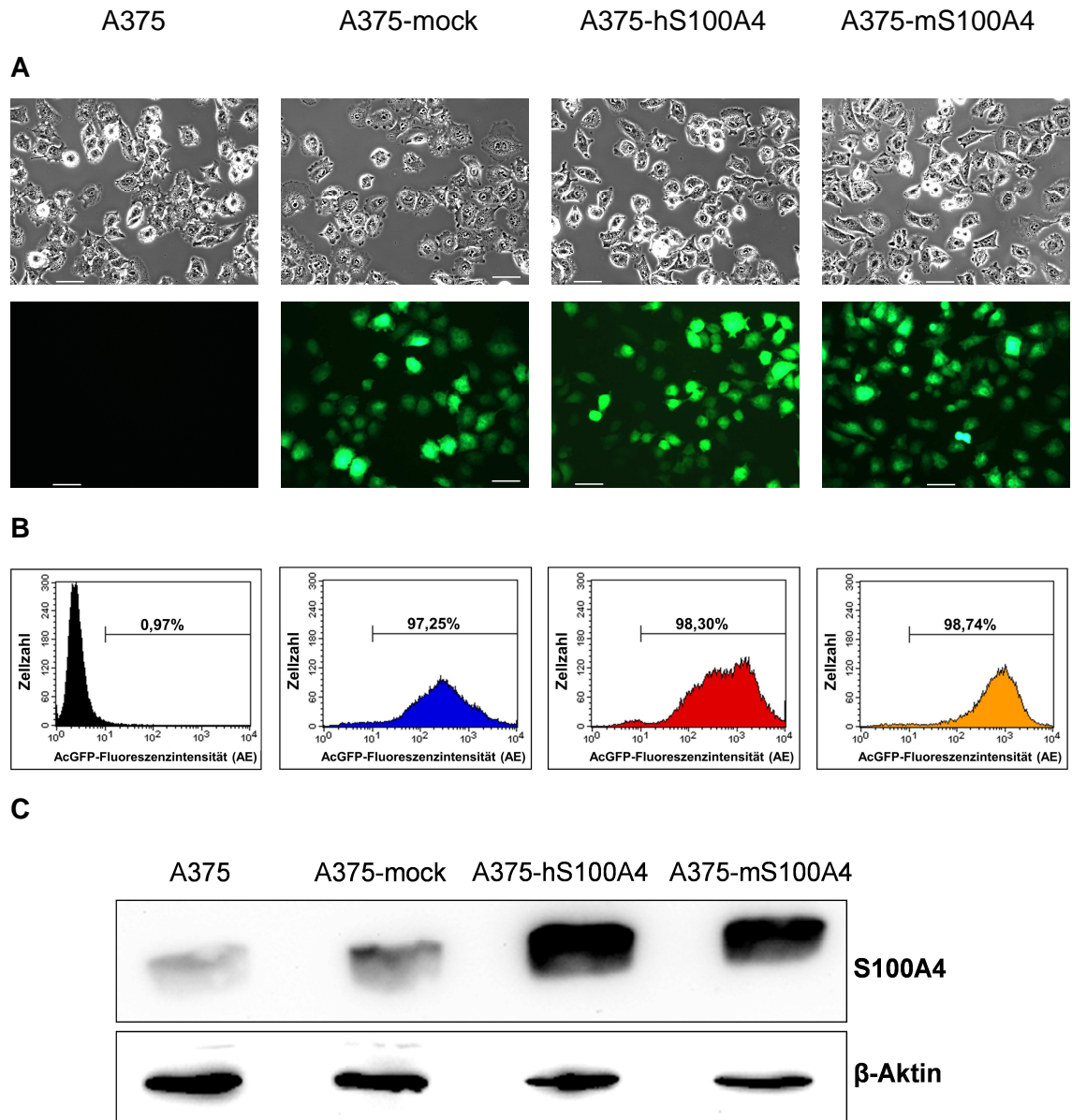


Abbildung 3-20: Nachweis der stabilen Transfektion von A375-Melanomzellen

(A) Gezeigt sind Lichtmikroskopie- (oben) und Fluoreszenz-Aufnahmen (unten) der transfizierten und nicht-transfizierten A375-Zelllinien (Balken: 50 µm). (B) Die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse der transfizierten Zellen zeigen den Anteil AcGFP1-positiver Zellen in % nach Exzitation mit 488 nm. (C) Nach der SDS-PAGE wurde mit Hilfe der Western-Blot-Analyse das S100A4-Protein bei 11 kDa im Gesamtzelllysate der transfizierten und nicht-transfizierten A375-Zellen nachgewiesen. Als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinmengen wurde parallel β-Aktin bei 42 kDa detektiert. Es wurden spezifische Antikörper verwendet.

3.6 Charakterisierung der stabil mit S100A4 transfizierten A375-Melanomzellen

3.6.1 Zellproliferation

Um den Einfluss der heraufregulierten S100A4-Proteinbiosynthese auf das Zellwachstum der A375-Melanomzellen zu untersuchen, wurde das Proliferationsverhalten der A375-hS100A4- und A375-mS100A4-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen A375-mock und A375 analysiert. **Abbildung 3-21** zeigt die Zellzahlen der einzelnen Zelllinien in Abhängigkeit von der Zeit. Es wird deutlich, dass die A375-hS100A4-Zellen von allen untersuchten Zelllinien am stärksten proliferieren und nach einer Kultivierungszeit von 120 Stunden die signifikant höchste mittlere Zellzahl aufweisen.

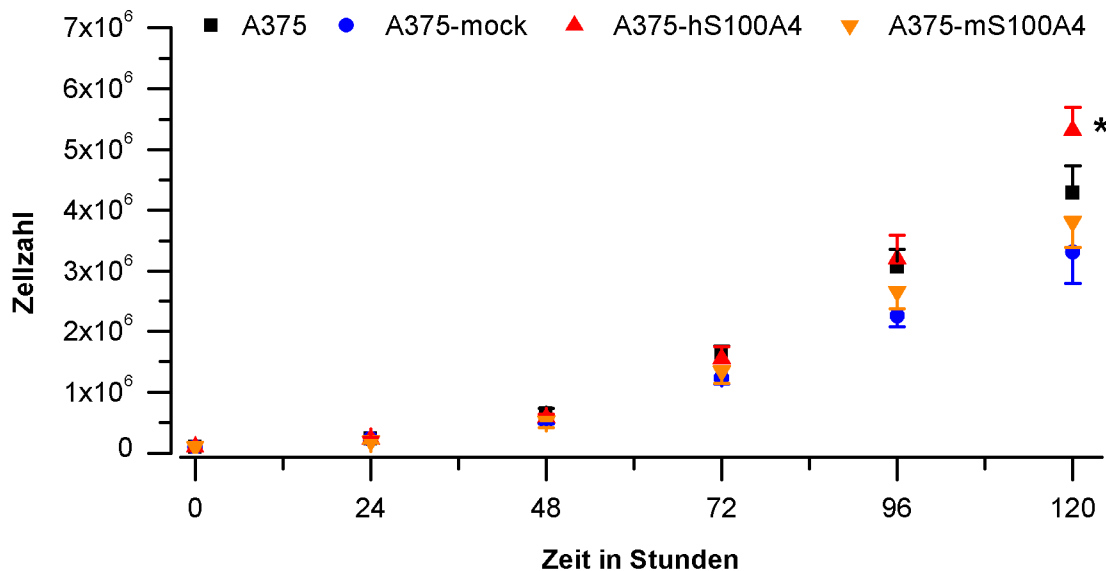


Abbildung 3-21: Untersuchung der Zellproliferation

Dargestellt sind die Zellzahlen von A375-mock-, A375-hS100A4-, A375-mS100A4- sowie von den nicht-transfizierten A375-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden 1×10^5 Zellen pro Kavität einer 6-well-Platte ausgesät und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde von je drei wells die Zellzahl bestimmt. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 9-12$ bei 3-4 unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$, bezogen auf A375, A375-mock bzw. A375-mS100A4 bei 120 h)

Zur weiteren Charakterisierung des Proliferationsverhaltens der Zelllinien wurde aus den Mittelwerten der Zellzahlen nach 72 Stunden (N_0) und der Zellzahlen nach 120 Stunden (N) die Verdopplungszeit anhand folgender Formel berechnet:

$$t_v = \frac{\log 2 \times 48 \text{ h (Kultivierungsdauer)}}{\log N - \log N_0}.$$

Die Verdopplungszeit in der logarithmischen Phase wurde für die A375-hS100A4-Zellen mit ca. 27 Stunden, für die A375-mS100A4-Zellen mit ca. 32 Stunden und für die A375-mock- und die A375-Zellen mit ca. 34 Stunden bestimmt. Damit bestätigt sich das stärkste Proliferationsverhalten der A375-hS100A4-Zellen gegenüber den drei anderen Zelllinien. Im Gegensatz zur Proliferationskurve spiegelt die berechnete Verdopplungszeit in der logarithmischen Wachstumsphase eine schnellere Proliferation der A375-mS100A4-Zellen im Vergleich zu den beiden Kontrollzelllinien A375 und A375-mock wieder.

3.6.2 Zellmotilität

Für die Untersuchung der Zellmotilität der A375- und stabil transfizierten A375-Melanomzellen (A375-hS100A4, A375-mS100A4 und A375-mock) wurde der *Scratch-Assay* durchgeführt (vgl. 2.6.7). Hierbei wurde einem konfluenten Zellrasen mit einer 200µl-Pipettenspitze eine definierte Verletzung („Kratzer“) von ca. 280-300 µm zugefügt. Nach 4, 6, 8 und 10 Stunden wurde die Verringerung der Spaltbreite durch die Bewegung der an diesem Wundbereich angrenzenden Zellen mit dem Mikroskop erfasst und die Spaltbreite ausgemessen. In **Abbildung 3-22 A** sind Mikroskopie-Aufnahmen der Zeitpunkte 0 h und 10 h gezeigt. Die relative Verringerung der Spaltbreite zu den verschiedenen Zeitpunkten ist **Abbildung 3-22 B** gezeigt. Die höchste Motilität zeigten die nicht-transfizierten A375-Zellen und unterschieden sich signifikant von allen untersuchten Zelllinien. Nach 10 Stunden Inkubation bei 37°C war im Vergleich zur Ausgangsspalte (100%) noch ein Wundbereich von $31 \pm 9\%$ vorhanden. Der Spaltbereich der A375-hS100A4-Zellen lag nach diesem Zeitraum bei $46 \pm 27\%$ gegenüber der Ausgangsspalte. Die geringste Motilität zeigten die A375-mock- und die A375-mS100A4-Zellen, wobei im Vergleich zur Ausgangsspalte nach 10 Stunden noch Spaltbreiten von $57 \pm 16\%$ bzw. $65 \pm 14\%$ vorhanden waren. Die Ergebnisse dieser ersten Versuchsreihe erwiesen sich allerdings nach weiterer Optimierung der Versuchsbedingungen in den vergangenen Jahren als unscharf (vgl. **Abbildung 3-23**).

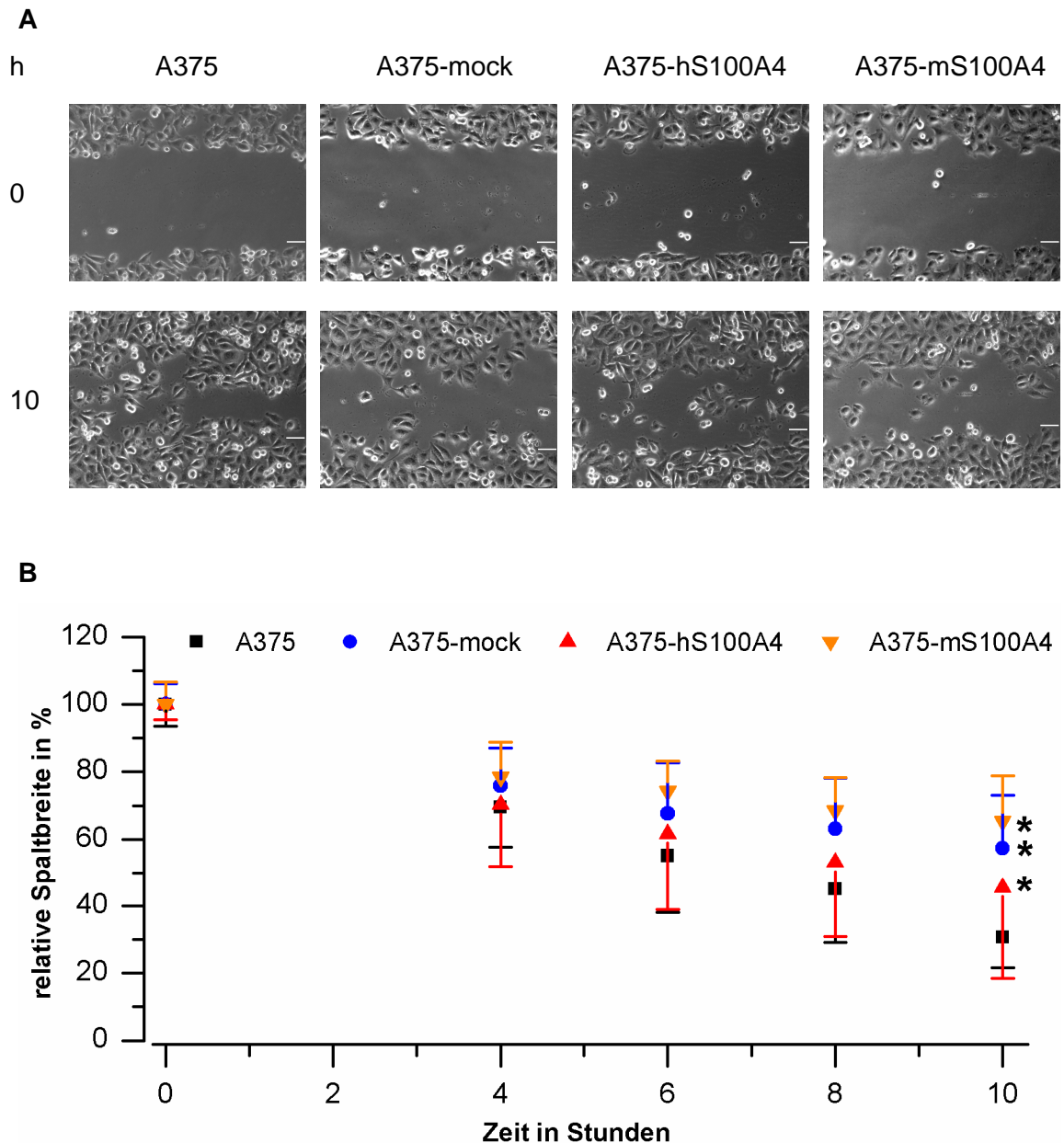


Abbildung 3-22: Untersuchung der Zellmotilität

Einem konfluenten Zellrasen wurde mit einer 200µl-Pipettenspitze eine definierte Wunde zugefügt und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde in diesem Bereich die Spaltbreite als Maß für die Motilität der Zellen erfasst. (A) Mikroskopie-Aufnahmen des Spaltes von nicht-transfizierten A375-, A375-mock, A375-hS100A4- und A375-mS100A4-Zellen. Zum Zeitpunkt 0 h sind alle Wunden ungefähr gleich breit. Nach 10 h ist die Spaltbreite durch einwandernde Zellen deutlich verringert (Balken: 50 µm). (B) Abgebildet ist die relative Spaltbreite in Abhängigkeit von der Zeit. (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3, * p < 0,05, bezogen auf A375 bei 10 h)

Aktuellste Untersuchungen in den Jahren 2011-2012 in unserer Arbeitsgruppe zur Motilität der A375- A375-mock- und A375-hS100A4-Zellen unter standardisierten Versuchsbedingungen (Inkubation in Kulturmedium mit 0,1% FKS) und einer hohen Anzahl von Versuchswiederholungen belegen, dass nach 24 Stunden der Spalt der

A375-hS100A4-Zellen signifikant geringer war als der Spalt der A375-mock und der nicht-transfizierten A375-Zellen (**Abbildung 3-23**). Im Vergleich zur Ausgangswunde betrug nach 24 Stunden der mittlere Wundbereich der A375-hS100A4-Zellen $55 \pm 6\%$, der A375-mock-Zellen $74 \pm 5\%$ und der A375-Zellen $67 \pm 8\%$. Demzufolge zeigen die A375-hS100A4-Zellen die höchste Motilität um den Wundbereich zu schließen.

Neu:

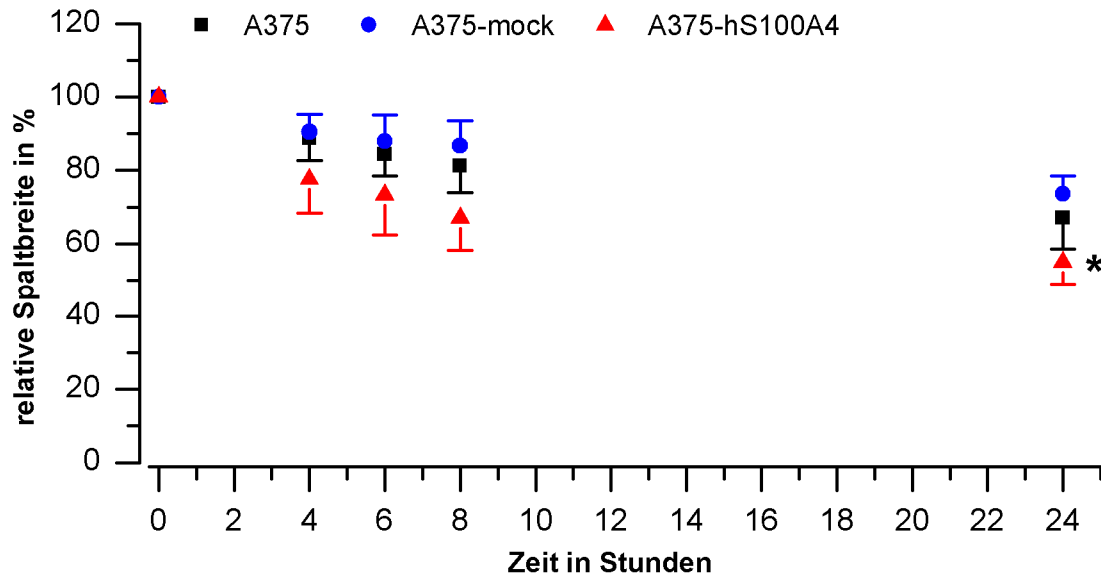


Abbildung 3-23: Aktuellste Untersuchung der Zellmotilität

Einem konfluenten Zellrasen wurde mit einer 200µl-Pipettenspitze eine definierte Wunde zugefügt und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde in diesem Bereich die Spaltbreite als Maß für die Motilität der Zellen erfasst. In Abweichung zu **Abbildung 3-24** wurden die Zellen in Kulturmedium mit 0,1% FKS kultiviert und die Versuchsdauer auf 24 h ausgedehnt. Die A375-mS100A4-Zellen wurden im Rahmen dieser Untersuchungen nicht mehr mitgeführt. Abgebildet ist die relative Spaltbreite in Abhängigkeit von der Zeit. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 9-12$, * $p < 0,05$, bezogen auf A375 bzw. A375-mock bei 24 h) (aus der Dissertation von Nadine Herwig, bisher unveröffentlichte Daten)

3.6.3 Zelladhäsion

Zur weiteren Charakterisierung der stabil transfizierten A375-Melanomzellen wurde das Adhäsionsverhalten der A375-hS100A4 und A375-mS100A4 im Vergleich zu den Kontrollen A375-mock und A375 analysiert. Für die Untersuchung wurden die Zellen zu Fibronectin-beschichteten Zellkulturplatten gegeben. Als Maß für die Zelladhäsion wurde die Adhäsionsfähigkeit der Zellen an Fibronectin, einem extrazellulären Matrixprotein, nach 40 Minuten Inkubation bei 37°C bestimmt (vgl. 2.6.8).

Aus der **Abbildung 3-25** wird ersichtlich, dass die Heraufregulierung der S100A4-Proteinbiosynthese bei den stabil transfizierten A375-S100A4-Melanomzellen zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsionsfähigkeit führt. Im Vergleich zu den nicht-

transfizierten A375-Zellen betrug die Verminderung der Zelladhäsion bei den A375-hS100A4-Zellen ca. 22% und bei den A375-mS100A4-Zellen ca. 15%. Gegenüber den A375-mock-Zellen adhärten ca. 18% weniger A375-hS100A4-Zellen an Fibronectin. Die A375-Zellen und die Vektor-Kontrolle (A375-mock) zeigten annähernd eine gleich starke Adhäsion an das extrazelluläre Matrixprotein (A375: 100%, A375-mock: 96%).

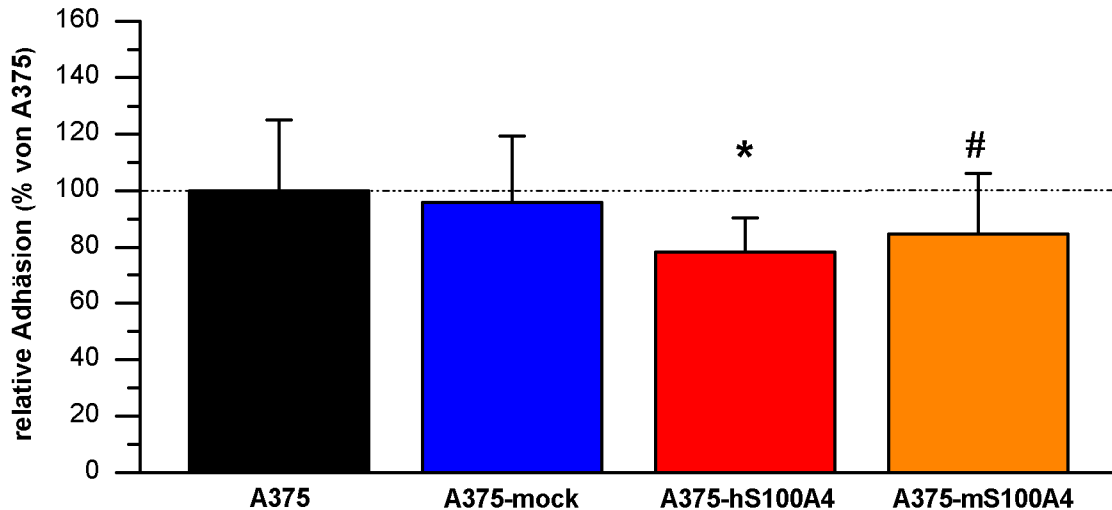


Abbildung 3-25: Untersuchung der Zelladhäsion an Fibronectin

Dargestellt ist die relative Adhäsion der transfizierten Zellen (A375-mock, A375-hS100A4, A375-mS100A4) prozentual zur nicht-transfizierten Kontrolle (A375 = 100%). Für den Versuch wurden für jede Zelllinie jeweils vier Fibronectin-beschichtete wells mit 5×10^5 Zellen pro Kavität einer 24-well-Platte ausgesät. Nach 40 min Inkubation bei 37°C wurden die adhärenen Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Durch Lyse der Zellen mit Triton X-100 wurde der Farbstoff herausgelöst und die Absorption bei 550 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm) bestimmt. Je größer die Absorption, desto mehr Zellen haben an Fibronectin gebunden. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 12$ bei 3 unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$ bezogen auf A375 bzw. A375-mock, # $p < 0,05$ bezogen auf A375)

3.6.4 Zellmigration

Zur Untersuchung der Migrationseigenschaften der A375- und stabil transfizierten A375-Melanomzellen (A375-hS100A4, A375-mS100A4 und A375-mock) wurde die Wanderung der Zellen durch eine Kapillarporenmembran (8 μ m Porendurchmesser) zu Zellkulturmedium mit und ohne 10% FKS (v/v) nach 24 Stunden bestimmt (vgl. 2.6.9). Die A375-hS100A4-Zellen zeigten im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375- und den A375-mock-Zellen eine signifikante Steigerung der Migrationsfähigkeit um ca. 50% (ca. das 1,5-fache) (**Abbildung 3-26**). Die Zunahme der Zellwanderung der A375-mS100A4-Zellen (129%) war nur gegenüber den nicht-transfizierten A375-Zellen signifikant und betrug ca. 29% (das 1,3-fache). Die A375-Zellen und die Vektor-

Kontrolle (A375-mock) zeigten eine annähernd gleiche Migrationsfähigkeit durch die Kapillarporenmembran (A375: 100%, A375-mock: 104%).

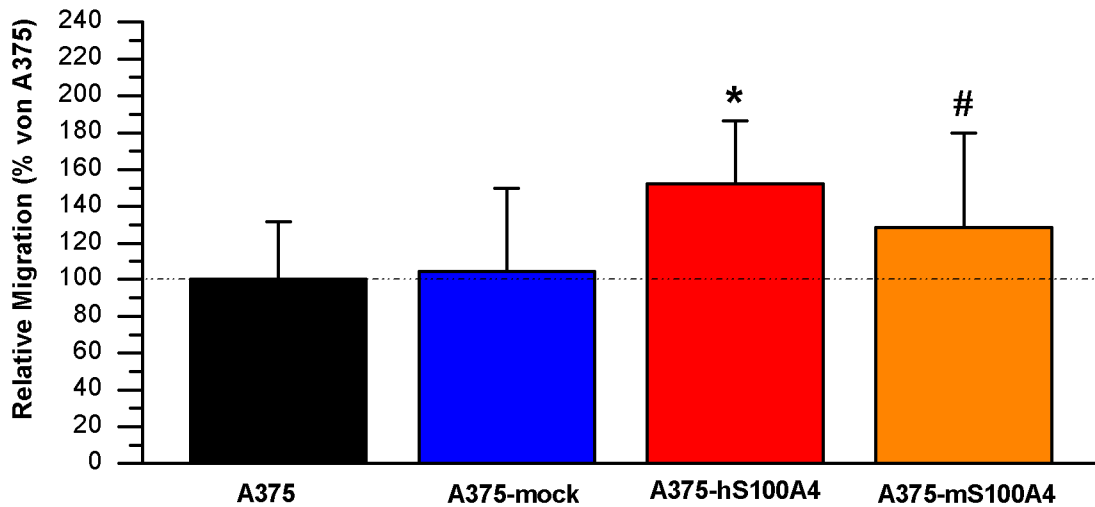


Abbildung 3-26: Untersuchung der Zellmigration

Abgebildet ist die relative Migration der transfizierten Zellen (A375-mock, A375-hS100A4, A375-mS100A4) durch eine Membran prozentual zur nicht-transfizierten Kontrolle (A375 = 100%). Es wurden für jede Zelllinie Zellkultureinsätze mit jeweils 2×10^5 Zellen pro Kavität einer 24-well-Platte als Dreifachbestimmung angelegt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden die durch die Membran gewanderten Zellen mit Calcein gefärbt und die Fluoreszenz (Exzitation: 485 nm; Emission: 528 nm) bestimmt. Je größer die Fluoreszenzeinheit, desto mehr Zellen sind migriert. Für die Auswertung wurden die Fluoreszenzeinheiten der ungerichteten, zufälligen Migration zu Zellkulturmedium ohne FKS von der direkten Migration zu 10% FKS (v/v) abgezogen. (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 9-12 bei 3-4 unabhängigen Experimenten, * p < 0,05 bezogen auf A375 bzw. A375-mock, # p < 0,05 bezogen auf A375).

3.6.5 Zellinvasion

Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens der A375- und stabil transfizierten A375-Melanomzellen (A375-hS100A4, A375-mS100A4 und A375-mock) wurde die Wanderung der Zellen durch eine Matrigelschicht (Mix aus verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen) auf der Kapillarporenmembran (8 μ m Porendurchmesser) zu Zellkulturmedium mit und ohne 10% FKS (v/v) nach 24 Stunden bestimmt (vgl. 2.6.10).

Der **Abbildung 3-27** ist deutlich zu entnehmen, dass die heraufregulierte Proteinbiosynthese von humanem S100A4 zu einer signifikanten Steigerung des invasiven Verhaltens durch die Matrigelschicht und die Kapillarporenmembran im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375-, A375-mock- und A375-mS100A4-Zellen führt. Die Zunahme der invasiv gewanderten A375-hS100A4-Zellen (630%) im Vergleich zu den A375-Zellen (100%) betrug ca. das 6-fache, gegenüber den A375-mock-Zellen (27%) ca. das 23-fache und gegenüber den A375-mS100A4-Zellen

(151%) ca. das 4-fache. Die A375-mS100A4-Zellen zeigten gegenüber der nicht-transfizierten Kontrolle kein signifikant gesteigertes, invasives Verhalten. Allerdings wanderte gegenüber den A375-mock-Zellen eine signifikant höhere Anzahl A375-mS100A4-Zellen (ca. das 6-fache) durch das Matrigel und die Kapillarporenmembran. Die A375-mock-Zellen zeigten im Vergleich zu den A375-Zellen ein signifikant vermindertes invasives Verhalten (ca. das 4-fache).

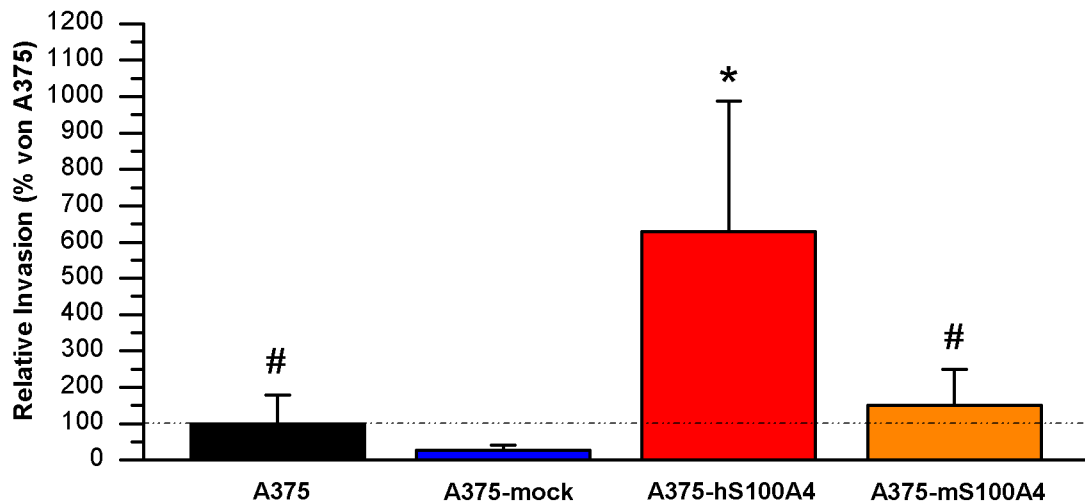


Abbildung 3-27: Untersuchung des Invasionsverhaltens durch Matrigel und Kapillarporenmembran
Dargestellt ist die relative Invasion der A375-mock, A375-hS100A4, A375-mS100A4-Zellen durch eine Matrigel-beschichtete Membran prozentual zur nicht-transfizierten Kontrolle (A375 = 100%). Für den Versuch wurde für jede Zelllinie als Dreifachbestimmung Zellkultureinsätze mit Matrigel beschichtet und in die Kavitäten einer 24-well-Platte eingehängt. In jeden Einsatz wurden jeweils 2×10^5 Zellen eingesät. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden die durch Matrigel und die Membran gewanderten Zellen mit Calcein gefärbt und die Fluoreszenz (Exzitation: 485 nm; Emission: 528 nm) bestimmt. Je größer die Fluoreszenzeinheit, desto mehr Zellen haben die Matrigel-beschichtete Membran durchwandert. Für die Auswertung wurden die Fluoreszenzeinheiten der ungerichteten, zufälligen Invasion zu Zellkulturmedium ohne FKS von der direkten Invasion zu 10% FKS (v/v) abgezogen. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 9-12$ bei 3-4 unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$ bezogen auf A375, A375-mock bzw. A375-mS100A4, # $p < 0,05$ bezogen auf A375-mock)

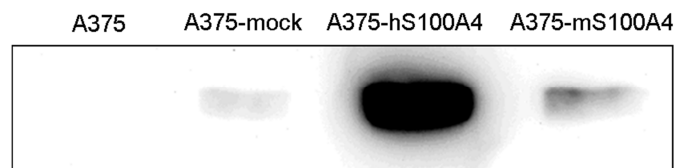
3.6.6 S100A4-Sekretion

S100A4 wird in der Zelle synthetisiert und in den Extrazellulärraum sezerniert. Die A375- und stabil transfizierten A375-Melanomzellen (A375-hS100A4, A375-mS100A4 und A375-mock) wurden daher auch hinsichtlich ihrer S100A4-Sekretion in das Zellkulturmedium untersucht. Es erfolgte die Analyse der Zellkulturüberstände mit einem Western Blot und anschließender S100A4-Immundetektion sowie mit einem S100A4-ELISA-Kit (vgl. 2.6.11).

Abbildung 3-28 A zeigt ein repräsentatives Bild des S100A4-Proteinnachweises im Kulturmedium der A375- und stabil transfizierten A375-Melanomzellen unter

Verwendung eines spezifischen S100A4-Antikörpers für das humane und murine S100A4-Protein. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden in Zellkulturmedium mit 0,2% FKS (v/v) wurde im Medium der A375-hS100A4-Zellen ein spezifisches Signal für S100A4 detektiert. Im Vergleich dazu wies das Kulturmedium der A375-mS100A4-Zellen eine deutlich schwächere S100A4-Proteinbande auf. Im Medium der A375-Zellen wurde kein S100A4-Protein nachgewiesen und ein äußerst schwaches Signal für S100A4 wurde im Kulturüberstand der A375-mock-Zellen detektiert.

A



B

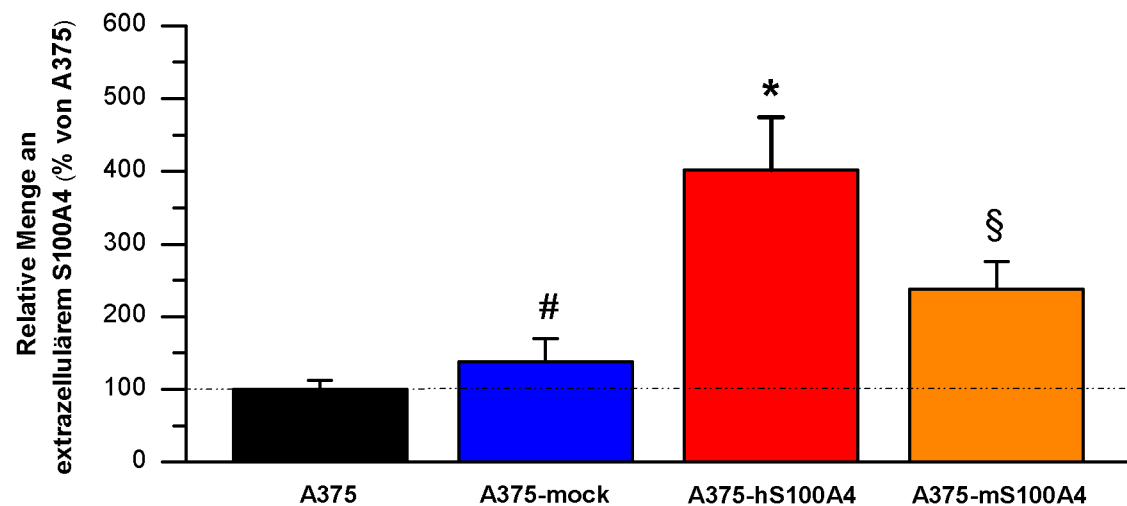


Abbildung 3-28: Untersuchung der S100A4-Sekretion

(A) Der Nachweis von sezerniertem S100A4 im Medium (0,2% FKS v/v) der A375-, A375-hS100A4, A375-mS100A4 und A375-mock-Zellen erfolgte durch die Western-Blot-Analyse nach SDS-PAGE. Für den Proteinnachweis wurde ein spezifischer S100A4-Antikörper verwendet. (B) Zur quantitativen Bestimmung von extrazellulärem humanem S100A4 in das umgebende Kulturmedium der Zellen innerhalb von 24 h wurde ein S100A4-ELISA-Kit verwendet. Dargestellt ist die relative Menge an extrazellulärem S100A4 der Zellen prozentual zur nicht-transfizierten Kontrolle (A375 = 100%). (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 4$ bei 2 unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$ bezogen auf A375, A375-mock bzw. A375-mS100A4, § $p < 0,05$ bezogen auf A375, A375-mock bzw. A375-hS100A4, # $p < 0,05$ bezogen auf A375)

Zur Quantifizierung der Menge an sezerniertem humanem S100A4-Protein in das Kulturmedium der A375-, A375-hS100A4-, A375-mS100A4- und A375-mock-Zellen wurde der human spezifische *Circulex™ S100A4 ELISA Kit* verwendet.

In **Abbildung 3-28 B** ist die relative Menge von extrazellulärem S100A4 im Medium der einzelnen Zelllinien nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C dargestellt: Die A375-hS100A4-Zellen sezernieren signifikant mehr S100A4 (54 ± 10 ng S100A4 /mg Gesamtprotein) in das umgebende Kulturmedium im Vergleich zu den A375- (13 ± 2), A375-mS100A4- (32 ± 5) und A375-mock-Zellen (18 ± 4 ng S100A4 /mg Gesamtprotein). Somit sezernieren die A375-hS100A4-Zellen im Vergleich zu den A375- und A375-mock-Zellen ca. die 4- bzw. 3-fache Menge an S100A4. Im Kulturmedium der A375-mS100A4-Zellen wurde ca. die doppelte Menge an extrazellulärem S100A4 im Vergleich zu beiden Kontrollen nachgewiesen.

3.6.7 S100A4-vermittelte Aktivierung von NF- κ B und RAGE

Des Weiteren wurde die Wirkung von extrazellulärem S100A4 hinsichtlich der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie der autokrinen Heraufregulierung von RAGE untersucht. Dafür wurden Zelllysate (vgl. 2.3.5) bzw. Zellkernextrakte (vgl. 2.3.6) von A375- und A375-hS100A4-Zellen verwendet. Zusätzlich wurden A375-Zellen untersucht, die für 24 Stunden mit Zellkulturmedium von A375-hS100A4-Zellen inkubiert wurden.

Die Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität der p65-Untereinheit von NF- κ B erfolgte in den Zellkernextrakten der Zelllinien mit Hilfe des *NF κ B-p65-Transkriptionsfaktor-Kit* (vgl. 2.6.12). Als Maß für die DNA-Bindungsaktivität von p65 wurde das gemessene Chemilumineszenzsignal auf die eingesetzte Proteinmenge normiert und prozentual zu den A375-Zellen dargestellt (**Abbildung 3-29**).

In den Zellkernextrakten der A375-Zellen wurde eine signifikant höhere DNA-Bindungsaktivität von p65 nach Zugabe von Zellkulturmedium der A375-hS100A4-Zellen ($176 \pm 30\%$) gegenüber den unbehandelten A375-Zellen (100%) festgestellt. Eine höhere DNA-Bindungsaktivität von p65 im Vergleich zu den unbehandelten A375-Zellen wurde ebenso in den Zellkernextrakten der A375-hS100A4-Zellen ($138 \pm 20\%$) nachgewiesen. Der positive Nachweis des Zellkernproteins p53 und nicht des Zellplasma Proteins β -Aktin bei den verwendeten Zellkernextrakten mit einem Western Blot und anschließender Immundetektion stellte die Reinheit der Präparationen sicher (Daten nicht gezeigt).

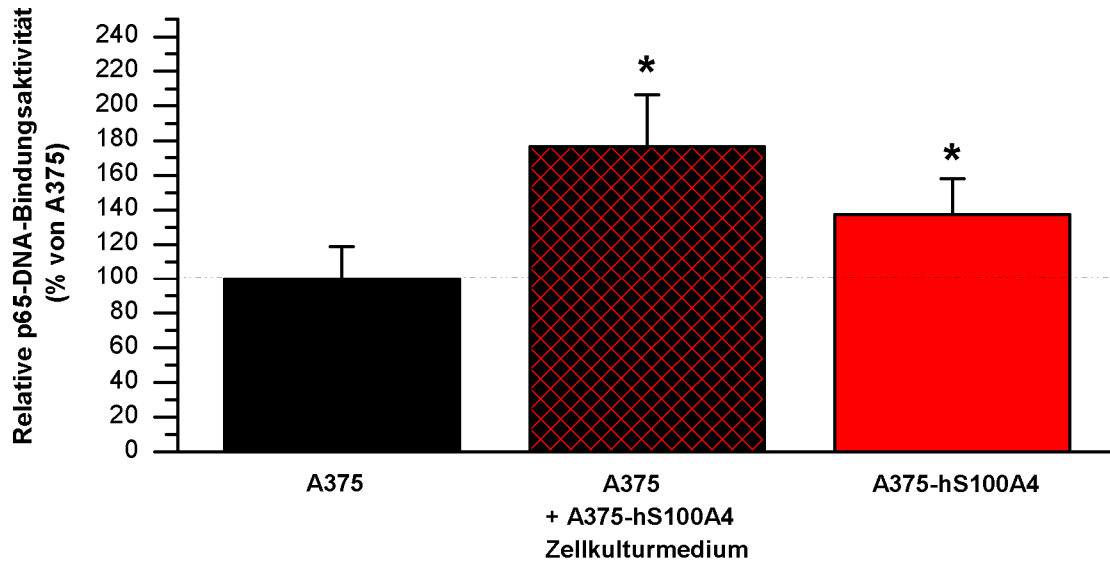
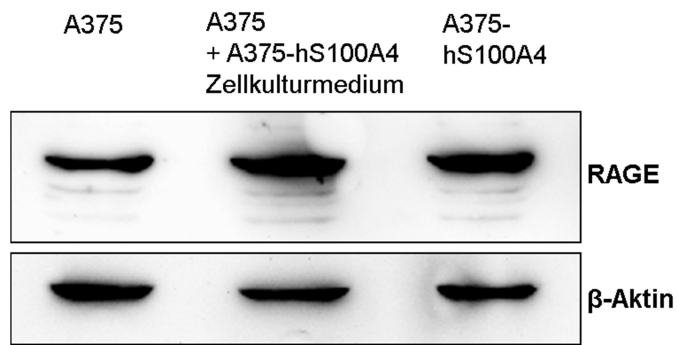


Abbildung 3-29: Untersuchung der NF- κ B-p65-DNA-Bindungsaktivität

Die Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität der NF- κ B-Untereinheit p65 in Zellkernextrakten von A375- und A375-hS100A4-Zellen sowie von A375-Zellen, die für 24 h mit Zellkulturmedium der A375-hS100A4-Zellen inkubiert wurden, erfolgte mit dem *NF- κ B-p65-Transkriptionsfaktor-Kit*. Als Maß für die DNA-Bindungsaktivität von p65 wurde das Chemilumineszenzsignal bestimmt und auf das Gesamtprotein im Zellkernextrakt bezogen. Dargestellt ist die relative p65-DNA-Bindungsaktivität prozentual zu den unbehandelten A375-Zellen (A375 = 100%). (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4 bei 2 unabhängigen Experimenten, * p < 0,05 bezogen auf die unbehandelten A375-Zellen)

Der Proteinnachweis für die Synthese von RAGE und als interne Kontrolle von β -Aktin erfolgte im Gesamtzelllysate der entsprechenden Zelllinien mit der Western-Blot-Analyse (vgl. 2.3.8). Die Spezifität der Antikörper für die Proteine RAGE (ca. 55 kDa) und β -Aktin (42 kDa) wurde bereits exemplarisch in Zelllysaten von Melanomzellen demonstriert (vgl. 3.4). **Abbildung 3-30** zeigt oben die Western-Blot-Analysen von RAGE und β -Aktin (**A**) und darunter die Auswertung der Proteinbanden nach densitometrischer Analyse der Grauwertstufen (**B**). In der Grafik ist die prozentuale Zunahme der RAGE-Proteinbiosynthese ausgehend von der Basissynthese der A375-Zellen (A375 = 100%) dargestellt. Die densitometrische Analyse ergab eine Zunahme der Proteinbiosynthese von RAGE bei den A375-Zellen um ca. 120%, nachdem die Zellen für 24 Stunden mit Zellkulturmedium der A375-hS100A4-Zellen inkubiert wurden. Ebenso synthetisieren die A375-hS100A4-Zellen mehr RAGE im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375-Zellen. Dabei ergab die Grauwertanalyse der Proteinbanden eine Erhöhung um ca. 75%.

A



B

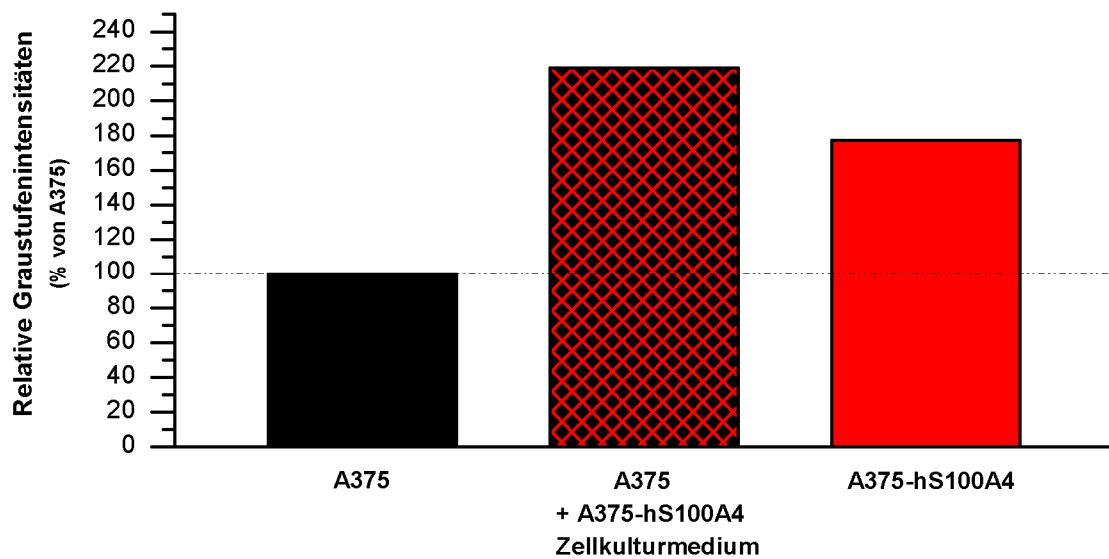


Abbildung 3-30: RAGE-Proteinnachweis bei A375-, A375- behandelten und A375-hS100A4-Zellen

(A) Die repräsentativen Western-Blot-Analysen nach SDS-PAGE zeigen RAGE (oben) und β -Aktin (unten) als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinmengen im Gesamtzelllysate von A375- und A375-hS100A4-Zellen sowie von A375-Zellen, die für 24 h mit Zellkulturmedium von A375-hS100A4-Zellen inkubiert wurden. Für den jeweiligen Proteinnachweis wurden spezifische Antikörper verwendet. (2 unabhängige Experimente) (B) Die Graustufenintensitäten der Proteinbanden der Western-Blot-Analysen aus (A) wurden semiquantitativ mit der Software TotalLab TL100 ausgewertet. Die Grauwerte der jeweiligen Proteinbande für RAGE wurden mit der Proteinbande der zugehörigen Ladungskontrolle (β -Aktin) normiert und prozentual zu den A375-Zellen dargestellt.

3.6.8 Tierexperimentelle Untersuchungen

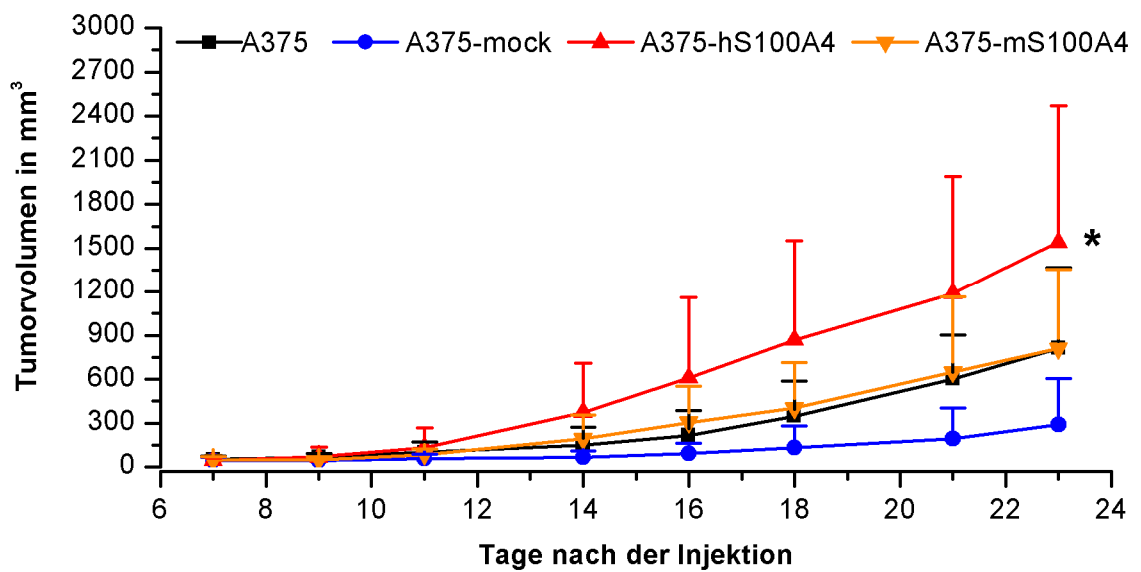
Um den Einfluss von S100A4 auf das subkutane Tumorwachstum und das Metastasierungsverhalten *in vivo* zu untersuchen, wurden die stabil transfizierten Zelllinien A375-hS100A4 und A375-mS100A4 sowie die Kontrollzelllinien A375-mock und A375 subkutan und intravenös in *nu/nu*-Nacktmäuse injiziert.

Subkutane Injektion

Nach subkutaner Applikation von 5×10^6 Zellen in den rechten Oberschenkel der Mäuse entwickelte sich bei jeder Maus ein lokaler Tumor im Bereich der Implantationsstelle. Die Tumorgöße wurde alle zwei bis drei Tage mit einem digitalen Messschieber bestimmt, wobei die erste Messung 7 Tage nach der Injektion erfolgte. In **Abbildung 3-31 A** ist das Tumorwachstum am Oberschenkel der Nacktmäuse in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Es wird ersichtlich, dass sich die Tumore der A375-hS100A4-Zellen in dem angegebenen Zeitraum schneller entwickelten als die Tumore der A375-mS100A4-, A375-mock- sowie der nicht-transfizierten A375-Zellen. Zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere, 23 Tage nach der Injektion, betrug das durchschnittliche Tumolvolumen der A375-hS100A4-Zellen $1541 \pm 928 \text{ mm}^3$ und der A375-Zellen $813 \pm 554 \text{ mm}^3$. Die Tumore der A375-mS100A4- und der A375-mock-Zellen wiesen zu diesem Zeitpunkt ein Volumen von $810 \pm 545 \text{ mm}^3$ und $292 \pm 313 \text{ mm}^3$ auf. Das schnellere Wachstum der subkutan injizierten A375-hS100A4-Zellen war gegenüber allen anderen injizierten Zellen ab Tag 14 signifikant.

Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften der transfizierten Zellen konnten die Tumore dieser Zellen mit dem KODAK *In-vivo-Imaging System FX-Pro* sichtbar gemacht werden (**Abbildung 3-31 B**). Es ist deutlich zu sehen, dass auch 23 Tage nach der Injektion der Zellen in die Mäuse die transfizierten Zellen das AcGFP1-Protein synthetisieren. Ebenso wurde bei den zu Versuchende entnommenen subkutanen Tumoren mittels Western Blot und S100A4-Immundetektion die Heraufregulierung der S100A4-Proteinbiosynthese bei Tumoren der A375-hS100A4- bzw. A375-mS100A4-Zellen im Vergleich zu den Tumoren der A375- und A375-mock-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde bei allen Fluoreszenz-Aufnahmen beobachtet, dass die A375-hS100A4-Zellen keinen kompakten Zellverband darstellen, sondern die fluoreszierenden Areale um den Injektionsbereich verteilt sind.

A



B

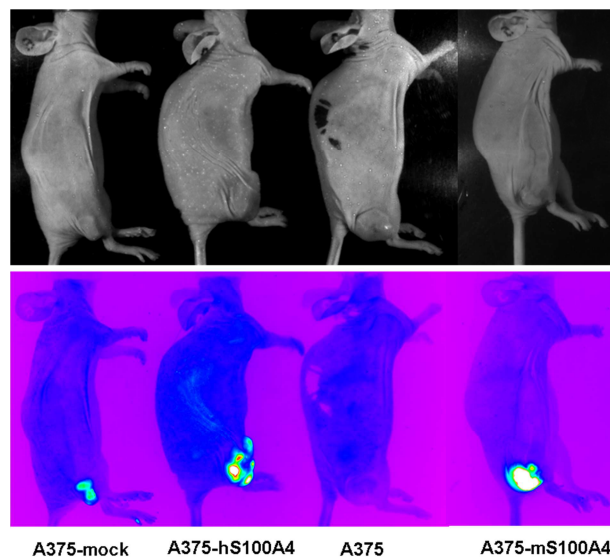


Abbildung 3-31: Untersuchung des subkutanen Tumorwachstums an Nacktmäusen

(A) In den rechten Oberschenkel von Nacktmäusen wurden A375- und stabil transfizierte A375-hS100A4-, A375-mS100A4- und A375-mock-Zellen subkutan injiziert. Dargestellt ist das aus den subkutanen Tumoren errechnete Tumolvolumen in Abhängigkeit von der Zeit. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 9-13$, bei 2 unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$ bezogen auf A375 bzw. A375-mock ab Tag 14 sowie A375-mS100A4 ab Tag 18). (B) Gezeigt sind Weißlicht- (oben) und Fluoreszenzaufnahmen (unten) der Tiere mit subkutanen Tumoren 23 Tage nach der Injektion der Zellen. (Die Farben kennzeichnen die Fluoreszenzintensität: blau < grün < gelb < rot < weiß).

Nach einer Beobachtungszeit von 23 Tagen wurden die Mäuse getötet und untersucht. Im Bauchraum der Nacktmäuse wurden makroskopisch keine Auffälligkeiten wie Metastasen an wichtigen Organen (Lunge, Leber, Herz, Darm) festgestellt. Einzelne

Organe wurden zusätzlich mit dem KODAK *In-vivo-Imaging System FX-Pro* begutachtet. Allerdings wurden dabei ebenfalls keine fluoreszierenden Areale detektiert, die auf Metastasen hindeuten. Lediglich die Gallenblase zeigte ein starkes Fluoreszenzsignal, welches vermutlich auf die Autofluoreszenz der Gallenflüssigkeit zurückgeführt werden kann (Bild nicht gezeigt).

Intravenöse Injektion

Nach der intravenösen Injektion von 1×10^6 A375- und stabil transfizierten A375-Zellen in die Schwanzvene von Nacktmäusen wurden die Tiere für 16 Wochen beobachtet. Äußerlich wurden keine Veränderungen (Verhalten, Gewicht, Atmung) bei den Tieren festgestellt. Jedoch bildeten sich bei einigen Mäusen Metastasen am Schwanz, die vermutlich durch verbliebene Zellen an der Injektionsstelle am Schwanz entstanden sind. Aufgrund der Vermehrung der Zellen erreichten diese Tumore am Mäuseschwanz teilweise eine solche Größe, dass die Tiere aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet werden mussten. Der Großteil der Versuchstiere wurde entweder während oder spätestens nach 16 Wochen getötet und alle wichtigen Organe (Lunge, Leber, Herz, Darm) wurden makroskopisch untersucht. Dabei wurden keine Auffälligkeiten hinsichtlich der Entwicklung von Metastasen festgestellt.

4 DISKUSSION

Die biochemische und radiopharmakologische Charakterisierung des S100A4-Proteins als Interaktionspartner für den Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (RAGE) sowohl unter In-vitro-Bedingungen als auch auf tierexperimenteller Ebene erforderte die Herstellung des rekombinanten S100A4-Proteins sowie dessen ¹⁸F-Radiomarkierung. Des Weiteren wurden stabil mit S100A4-transfizierte A375-Melanomzellen generiert und aufgrund der dadurch heraufregulierten S100A4-Proteinbiosynthese und -Sekretion die Beteiligung von S100A4 an zellulären Metastasierungsprozessen untersucht und in Hinblick auf die Interaktion mit RAGE diskutiert.

4.1 Gewinnung von rekombinantem humanem S100A4-Protein

Zur Herstellung von rekombinantem S100A4-Protein wurde der prokaryotische Expressionsvektor pGEX-6P-1 verwendet. Mit diesem Vektor ist es möglich in *E. coli* S100A4 als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* zu synthetisieren. Aufgrund der leichten genetischen Manipulation, der kurzen Generationszeit und der unproblematischen Handhabung wird für die Gewinnung rekombinanter Proteine am häufigsten *E. coli* eingesetzt. Die Bakterien können in einem einfachen Fermentationsprozess zu hohen Zelldichten herangezogen werden und große Mengen an rekombinantem Protein synthetisieren. Allerdings kann die hohe Anreicherung fremder Proteine für *E. coli* toxisch sein, so dass ein starker, regulierbarer Promotor für die Steuerung der Fremd-Gen-Expression notwendig wird. Zur Regulierung der Proteinbiosynthese enthält der pGEX-6P-1-Vektor den starken *tac*-Promotor, welcher erst nach der Induktion durch das Laktose-Analogon Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) mit der Transkription beginnt. Dabei wird durch das ebenso im Vektor enthaltene *LacI^q*-Gen das *LacI^q*-Repressorprotein synthetisiert, welches an die DNA bindet und somit die Expression des GST-Fusionsproteins verhindert. Nach Zugabe von IPTG, löst sich *LacI^q* von der DNA und die RNA-Polymerase transkribiert das klonierte Fremdgen [188]. Des Weiteren zeichnet sich der Vektor durch eine hohe Genexpressionsrate und aufgrund des GST-Epitops durch eine einfache chromatographische Reinigung sowie effiziente Abspaltung dieses GST-Epitops aus und bietet somit eine kostengünstige Alternative zur chemischen Synthese der einzelnen Peptide [189].

Die Synthese der GST-S100A4-Fusionsproteine erfolgte in *E. coli*-Zellen vom Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, welcher aufgrund der Koexpression seltener t-RNAs eine erhöhte Translationseffizienz des Zielproteins ermöglicht und aufgrund des Fehlens der Protease-kodierenden Gene *ompT* und *lon* eine verminderte proteolytische Degradierung des rekombinanten GST-S100A4-Fusionsproteins durch die Wirtszelle zeigt (aus dem Datenblatt für BL-21-CodonPlus®-kompetente Zellen). Nachteil eines prokaryotischen Expressionssystems ist, dass Proteine in *E. coli* nach der Translation nicht in gleicher Weise weiterverarbeitet werden wie in Eukaryonten. So führen Bakterien keine posttranslationalen Modifikationen wie etwa die Abspaltung von Signalsequenzen oder die Anheftung von Zucker- bzw. Phosphatgruppen (Glykosylierung, Phosphorylierung) durch. Allerdings sind nach derzeitigem Stand der Forschung für S100A4 keine derartigen Modifikationen nach der Proteinbiosynthese bekannt. Demzufolge ist die Expression und Synthese von rekombinantem S100A4 in *E. coli* möglich und wurde auch schon mehrfach in der Literatur gezeigt [20, 22, 25, 26, 80, 81, 87, 105, 190-195]. Ebenso wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe der pGEX-6P-1-Vektor für die erfolgreiche Synthese von biologisch aktiven S100A1, S100A12 und S100B verwendet [196, 197].

Die Induktion der Proteinbiosynthese mit 1 mmol/l IPTG und der daran anschließenden vierstündigen Expressionsdauer erbrachte eine sehr gute Ausbeute an löslichen GST-S100A4-Fusionsproteinen, welche mittels Affinitätschromatographie aus dem Zelllysat isoliert wurden (vgl. 3.1.2). Dabei bindet der GST-Anteil des Fusionsproteins reversibel an sein Substrat Glutathion, welches immobilisiert an Agarose vorliegt. Die proteolytische Abspaltung des GST-Epitops erfolgte durch die *Precision*TM Protease, die spezifisch die Aminosäuresequenz LEVLFQ/GP im Fusionsprotein erkennt und spaltet, woraufhin entsprechend der Herstellerangaben im Eluat nur noch rekombinantes S100A4-Protein vorliegen sollte. Allerdings waren nach dieser Reinigungsprozedur im Eluat neben S100A4-Monomer und -Dimer noch etliche Verunreinigungen wie ungespaltene Fusionsproteine, abgespaltene Glutathion-S-Transferase und unbekannte Protein-verunreinigungen vorhanden. Daher wurde eine zweite Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie angeschlossen, wodurch größtenteils alle Verunreinigungen entfernt und ein Reinheitsgrad für das rekombinante S100A4-Protein von ca. 92% erreicht wurde. Mit Hilfe eines Western Blots und einer massenspektrometrischen Analyse wurde das S100A4-Monomer bei 12 kDa und das S100A4-Dimer bei 24 kDa identifiziert (vgl. 3.1.3). Eine ähnliche Verteilung der

monomeren und SDS-resistenten dimeren Form des rekombinanten S100A4-Proteins in einem SDS-Polyacrylamid-Gel ist mehrfach in der Literatur belegt [20, 198-200].

Die Etablierung dieser Reinigungsstrategie ermöglichte die Herstellung des rekombinanten S100A4-Proteins aus *E. coli*-Zelllysaten mit hohen Ausbeuten und einem guten Reinheitsgrad.

4.1.1 Radiomarkierung von rekombinatem S100A4 mit [¹⁸F]SFB

Die Radiomarkierung des rekombinanten S100A4-Proteins mit dem Aktivester N-Succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB) ist aufgrund der milden Reaktionsbedingungen, den kurzen Reaktionszeiten und der relativ kleinen Größe des gekuppelten [¹⁸F]Fluorbenzoylrestes, wodurch die biologische Aktivität von S100A4 kaum beeinträchtigt werden sollte, ein idealer Markierungsbaustein für Proteine. Das Radionuklid ¹⁸F bietet durch die geringe Reichweite bei einem hohen Anteil an Positronenemission sowie der günstigen Halbwertszeit von 110 Minuten optimale Voraussetzungen für den Einsatz bei der Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Die erfolgreiche Radiomarkierung von S100-Proteinen mit [¹⁸F]SFB wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe gezeigt. Dabei wurde keine Beeinträchtigung der biologischen Aktivität und Funktionalität der ¹⁸F-S100-Proteine beobachtet [179, 197].

Im Anschluss an die Radiomarkierung wurde das ¹⁸F-S100A4-Präparat mittels Größenausschlusschromatographie von radioaktiven Nebenprodukten sowie nicht umgesetztem [¹⁸F]SFB abgetrennt und lag mit einer radiochemischen Reinheit von $\geq 95\%$ sowohl in der monomeren (58%) als auch in der dimeren (37%) Form vor (vgl. 3.3.1). Der hohe Anteil an SDS-resistenten ¹⁸F-S100A4-Dimeren kommt durch die Verwendung einer kalziumhaltigen Puffers (c (Ca²⁺) = 1,3 mmol/l) während der Reinigungsprozedur zustande. Die Bindung von Kalzium führt zu einer deutlichen Konformationsänderung in der kanonischen EF-Hand des S100A4-Proteins. Des Weiteren wurde in der Literatur gezeigt, dass durch die Bindung von Kalzium das S100A4-Proteindimer stabilisiert wird [201] und dass für die meisten intrazellulären S100A4-Interaktionen die kalziumabhängige Konformationsänderung notwendig ist [17]. Demzufolge wurde für die Untersuchung der ¹⁸F-S100A4-RAGE-Interaktion in kalziumhaltigem Puffer gereinigtes ¹⁸F-S100A4-Protein verwendet.

4.2 Bindung von S100A4 an RAGE

4.2.1 In-vitro-Bindung von S100A4 und ^{18}F -S100A4 an sRAGE

Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse

Die In-vitro-Untersuchung der Interaktion zwischen S100A4 und dem RAGE-Rezeptor erfolgte mit der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (SPR) (vgl. 3.3.2). Dabei wurde der rekombinante sRAGE, die lösliche Form des RAGE-Rezeptors ohne Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, kovalent an den CM5-Sensorchip immobilisiert. Die Zugabe von rekombinantem S100A4-Protein in steigenden Konzentrationen (2,5 – 20 $\mu\text{mol/l}$) führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Signalintensität auf dem Sensorchip (Assoziation), während bei der anschließenden Inkubation mit Puffer eine deutliche Reduzierung der Signalstärke registriert wurde (Dissoziation). Somit findet auf dem Sensorchip eine spezifische Wechselwirkung zwischen rekombinantem S100A4 und immobilisiertem, rekombinanten sRAGE statt.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten ist die iterative Anpassung definierter Modelle an die aufgenommenen Messwerte notwendig. Dabei zeigte die Anwendung des Zwei-Stufen-Modells die größte Übereinstimmung mit den gemessenen S100A4-RAGE-Bindungskurven. Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass es nach der 1:1-Bindung des Analyten an den immobilisierten Liganden zu einer Konformationsänderung kommt, die zu einer Stabilisierung des Komplexes führt und dass erst nach Umkehrung dieser Strukturänderung die Dissoziation des Komplexes erfolgen kann [202]. Demzufolge kommt es wahrscheinlich nach der Bindung von S100A4 an die immobilisierte sRAGE-Form zu Strukturänderungen im RAGE-Molekül. Ein solches Zwei-Stufen-Modell wurde bereits für die Interaktion zwischen AGE und der V-Domäne von RAGE (vRAGE) vorgeschlagen. Dabei findet eine Konformationsänderung statt, um den Komplex mit hydrophoben Wechselwirkungen zu stabilisieren [203].

In der Literatur wurde gezeigt, dass RAGE in der Plasmamembran in Form von konstitutiven Oligo- bzw. Multimeren zu finden ist und die Bindung von Liganden diese Rezeptoransammlung stabilisiert [142, 160, 204]. Die V- und C1-Domäne bilden im RAGE-Molekül eine funktionelle Einheit, welche über ein flexibles Verbindungsstück mit der C2-Domäne verbunden ist. Anhand von Strukturanalysen wurde gezeigt, dass die meisten Liganden an die V- bzw. VC1-Domäne binden [205]. Dabei stellt das S100A6-Protein aufgrund der Interaktion mit der C2-Domäne eine Ausnahme dar

[123]. **Abbildung 4-1** gibt eine Übersicht über die Bindung ausgewählter Liganden an bestimmte Domänen des RAGE-Rezeptors. Die meisten Bindungsstudien deuten die V-Domäne als primäre Liganden-Bindungsseite während die C1-Domäne eine bedeutende Rolle bei der Liganden-Erkennung [123, 125] bzw. bei der Stabilisierung der V-Domäne übernimmt [141]. Die Unterteilung in VC1-Tandemdomäne und C2-Domäne spiegelt auch die verschiedenen Ladungseigenschaften der Domänen wieder. Aufgrund des hohen Anteils an Arginin- und Lysinresten hat die RAGE-VC1-Domäne eine positive Ladung [203, 206]. Die Oberfläche der C2-Domäne besteht vorwiegend aus sauren Aminosäureresten und ist negativ geladen [205]. Daher wurde vorgeschlagen, dass die negativ-geladene C-Domäne von HMGB1, AGEs sowie die sauren S100-Proteine von der positiv-geladenen VC1-RAGE-Domäne angezogen werden und es sich somit bei diesen RAGE-Ligand-Interaktionen um elektrostatische Anziehungskräfte handelt [205, 207].

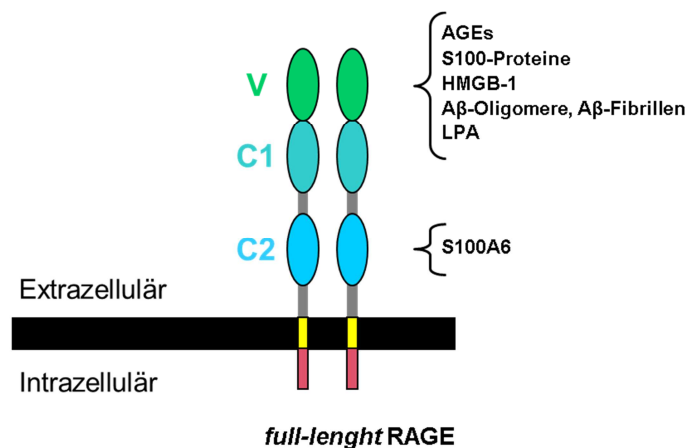


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung von RAGE und seinen Liganden

Der extrazelluläre Teil von RAGE besteht aus der V-, C1- und C2-Domäne, wobei die V- und C1-Domäne eine strukturelle Einheit bilden. Die meisten RAGE-Liganden binden entweder an die V-Domäne oder an die VC1-Tandemdomäne. (modifiziert nach [152, 208])

Die ermittelten Dissoziationskonstanten (K_D) für die S100A4-RAGE-Bindung lagen im Bereich zwischen $0,86 \mu\text{M}$ und $115,6 \mu\text{M}$ ($\bar{\Delta} 27,8 \mu\text{M}$). Die recht große Streuung der K_D -Werte kommt vermutlich dadurch zustande, dass die verwendeten rekombinanten Proteine für die unabhängigen Versuche mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren wurden, wodurch die einzelnen Proteinproben unterschiedlichen Konzentrationen an funktionstüchtigem Protein enthielten. Des Weiteren liegt das rekombinante S100A4-Protein sowohl in der monomeren als auch in der dimeren Form in Lösung vor, wodurch vermutlich je nach gebundener Proteinform unterschiedliche Masse-

Veränderungen auf dem sRAGE-Chip gemessen wurden. Eine weitere Erklärung für die große Streuung der K_D -Werte zwischen den einzelnen Messungen ist die aufgrund immer wieder erneuerter Immobilisierungen hervorgerufene unterschiedliche Moleküldichte von sRAGE auf der Sensoroberfläche.

In der Literatur sind mit SPR-Untersuchungen Bindungskonstanten für die S100A4-RAGE-Interaktion von $0,138 \pm 0,028 \mu\text{M}$ [125] bzw. für das S100A4-Dimer von $0,62 \mu\text{M}$ [116] ermittelt wurden. In Abweichung zu der vorliegenden Arbeit wurden dabei auf dem Sensorchip sRAGE-Fc-Chimären und Biotin-markierter RAGE [116] sowie RAGE als GST-Fusionsprotein (GST-RAGE) [125] immobilisiert, wodurch eventuell eine bessere Zugänglichkeit der Bindungsdomäne für das S100A4-Protein erreicht wurde, die zu einer höheren Bindungsaffinität führte.

sRAGE-Bindungsassay

Zum anderen konnte in einem weiteren Bindungsexperiment, bei dem sRAGE an *MaxiSorb*[™]-Mikrotiterplatten immobilisiert wurde, ebenfalls die spezifische Interaktion von ¹⁸F-markiertem S100A4 an sRAGE nachgewiesen werden (vgl. 3.3.2). Allerdings ergab der Vergleich mit anderen S100-Proteinen für S100A4 die geringste spezifische Bindung zu sRAGE. So wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe mit dem gleichen Bindungsexperiment für andere S100-Proteine eine deutlich höhere Affinität zu sRAGE gezeigt [179].

Die Ergebnisse zur Bindung des aus *E. coli* gereinigten rekombinanten S100A4- und ¹⁸F-markierten-S100A4-Proteins an sRAGE belegen die biologische Aktivität der Proteine trotz der acht zusätzlichen Aminosäuren und dem [¹⁸F]Fluorbenzoylrest am N-Terminus. Ebenso zeigen Strukturanalysen, dass die Bindung an Zielproteine vorrangig im C-terminalen Bereich des aktiven Kalzium-gebundenen S100A4-Moleküls stattfindet [19, 25].

Schlussfolgernd aus den in unserer Arbeitsgruppe ermittelten In-vitro-Bindungsdaten für verschiedene RAGE-Liganden ergibt sich folgende Reihenfolge hinsichtlich ihrer Affinität zu RAGE: Die höchste Affinität wurde für glykLDL ($K_D = 0,0059 \mu\text{M}$) ermittelt, dann folgten die Affinitäten der S100-Proteine mit ¹⁸F-S100A12 ($K_D = 0,34 \mu\text{M}$) > ¹⁸F-S100A1 ($K_D = 1,1 \mu\text{M}$) > ¹⁸F-S100B ($K_D = 3,1 \mu\text{M}$) > ¹⁸F-S100A4 ($K_D = 27,8 \mu\text{M}$) [179].

4.2.2 Assoziation von ^{18}F -S100A4 an Melanom- und Endothelzellen

Zur weiteren Charakterisierung von ^{18}F -S100A4 im Hinblick auf die Interaktion mit RAGE wurden Zellassoziationsstudien an A375-Melanomzellen und Endothelzellen (HAEC) bei 37°C und 4°C durchgeführt (vgl. 3.3.3). Zuvor wurde die RAGE-Proteinbiosynthese bei diesen Zellen nachgewiesen. Die A375-hRAGE-Zellen zeigten eine deutliche Heraufregulierung von RAGE-Protein im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375- und den A375-mock-Zellen. Im Vergleich zu den Melanomzellen war die RAGE-Proteinbiosynthese bei den Endothelzellen (HAEC) deutlich geringer. Die Genexpression und Proteinbiosynthese von RAGE wurde in den A375-Melanomzellen bereits von Abe et al. und in den Endothelzellen aus der Aorta (HAEC) von Hoppmann et al. nachgewiesen [178, 179].

Die Ergebnisse der Zellbindungsstudien verdeutlichen, dass die A375-hRAGE-Zellen sowohl bei 37°C als auch bei 4°C eine höhere ^{18}F -S100A4-Assoziation zeigen im Vergleich zu den A375- und den A375-mock-Zellen. Bei 4°C war diese Bindung statistisch signifikant. Aufgrund der heraufregulierten RAGE-Proteinbiosynthese der A375-hRAGE-Zellen muss angenommen werden, dass ^{18}F -S100A4 selektiv an RAGE-Rezeptoren auf der Zelloberfläche bindet und dafür keine energieabhängigen Prozesse bei 37°C notwendig sind. In der Literatur wird RAGE in erster Linie als nicht-internalisierender Rezeptor beschrieben [120, 209]. Allerdings wurde ebenso die Internalisierung des Liganden-RAGE-Komplexes je nach Ligand und Zelltyp diskutiert [210-212], wodurch sich die tendenziell höhere Assoziation an A375-hRAGE-Zellen bei 37°C erklärt lässt. Doch vermutlich kommen ebenso andere internalisierende Rezeptoren bei A375-Zellen für ^{18}F -S100A4 in Frage.

Die Endothelzellen zeigten eine spezifische Bindung von ^{18}F -S100A4 bei 37°C; die zelluläre ^{18}F -S100A4-Assoziation wurde durch vorherige Zugabe von nicht-markiertem rekombinantem S100A4-Protein signifikant inhibiert.

Die signifikant höhere Assoziation von ^{18}F -S100A4 bei 37°C im Vergleich zu 4°C bei beiden Zelllinien zeigt an, dass Liganden-Bindungs- bzw. Aufnahmeprozesse bei 4°C deutlicher langsamer ablaufen als im physiologischen Temperaturoptimum von 37°C.

Insgesamt betrachtet war die Assoziation von ^{18}F -S100A4 an Endothelzellen höher als an die A375-hRAGE-Zellen, so dass vermutlich neben RAGE ebenso internalisierende Scavenger-Rezeptoren [179, 209] und andere endotheliale Oberflächenstrukturen wie z. B. Annexin II zur Bindung von S100A4 auf der Zelle beitragen [74].

4.3 In-vivo-Untersuchungen mit ^{18}F -S100A4

Anhand der Untersuchungen zur Stabilität und Bioverteilung sowie die dynamischen PET-Untersuchungen mit ^{18}F -S100A4 bei Ratten konnten der Metabolismus und potentielle Gewebe-spezifische Interaktionen des ^{18}F -S100A4-Proteins *in vivo* charakterisiert werden. Die Überprüfung der metabolischen Stabilität von ^{18}F -S100A4 im Blutplasma einer Ratte ergab, dass ein proteolytischer Abbau des ^{18}F -S100A4-Proteins stattgefunden hat (vgl. 3.3.4). In der Radio-SDS-PAGE wurden Proteinbanden unter 12 kDa detektiert, die vermutlich Peptid-Metaboliten des ^{18}F -S100A4-Proteins darstellen. Demzufolge konnte dem ^{18}F -S100A4-Monomer und -Dimer nach 30 Minuten noch ca. 90% der ^{18}F -Aktivität und nach 60 Minuten noch ca. 67% der ^{18}F -Aktivität zugeordnet werden. Bei ^{18}F -markiertem S100A1, S100B, S100A12 [197] sowie S100A11 (nicht veröffentlichte Daten) wurde ein solcher enzymatischer Abbau *in vivo* nicht beobachtet.

Sowohl die Bioverteilungs- (vgl. 3.3.5) als auch die PET-Untersuchungen (vgl. 3.3.6) von ^{18}F -S100A4 zeigten innerhalb weniger Minuten eine hohe Akkumulation in den Nieren sowie maßgebliche Anreicherungen in Milz, Leber, Blut, Lunge und den Nebennieren.

Aufgrund der über zwei Stunden anhaltenden hohen Aktivität in den Nieren und des Aktivitätsnachweises im Urin kann davon ausgegangen werden, dass ^{18}F -S100A4 überwiegend renal ausgeschieden wird. Dies verdeutlicht ebenso die Zeit-Aktivitätskurve, in der nicht nur ein Zusammenhang zwischen abnehmender ^{18}F -Aktivität in der Lunge bzw. kardialen Blutpool und Zunahme der Radioaktivitätskonzentration in der Niere, sondern auch die im Vergleich zu Lunge und Blutpool langsamer verlaufende Eliminierung von ^{18}F -S100A4 in der Niere ersichtlich wird. Die geringe Größe des S100A4-Proteins von ca. 12 kDa lässt auf eine glomeruläre Filtration in der Niere schließen [213]. Zudem ist der koronaren Schnittebene einer PET-Aufnahme zu entnehmen, dass die Hauptanreicherung der radioaktiven Substanzen im Nierenkortex stattgefunden hat, in welchem sich die Funktionseinheiten der Niere, die Nierenkörperchen befinden [213]. Ebenso wurde auch für andere S100-Proteine wie S100A1, S100A12 und S100B die Exkretion über die Nieren mit vermutlicher Degradierung im proximalen Tubulus beobachtet [179, 197, 214, 215].

Die Aktivitätsanreicherung in der Leber deutet auf eine Metabolisierung von ^{18}F -S100A4 hin. Allerdings kann aufgrund der geringen Aktivität in der Galle auf eine geringere Bedeutung bei der Ausscheidung von ^{18}F -S100A4 geschlossen werden.

Des Weiteren verdeutlichen die Ergebnisse der Bioverteilungen und PET-Untersuchungen substanzielle Anreicherungen in Organen und Geweben, die RAGE synthetisieren. Zahlreiche Publikationen belegen das Vorkommen von RAGE unter homöostatischen Bedingungen in einem sehr hohen Maß in der Lunge, insbesondere in der Basalmembran von Alveolar Typ I Epithelzellen bei Ratte, Kuh und Mensch [129, 179, 216, 217]. Daher ist die Lunge als Referenzorgan für die Synthese von RAGE zu betrachten. Des Weiteren wurde RAGE in niedrigen bis moderaten Mengen in Leber, Herz, Gehirn, Niere und Skelettmuskel auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen. Ebenso konnte der Rezeptor in den medialen, glatten Muskelzellen und in den meisten Endothelzellen der Blutgefäße nachgewiesen werden [129, 179]. Demnach ist eine Interaktion von ^{18}F -S100A4 mit RAGE vor allem in der Lunge, aber auch in Blutgefäßen, Leber, Herz und Niere zu erwarten. Dies bestätigen auch die Zeit-Aktivitätskurven, die aufgrund der langsameren Eliminierung von ^{18}F -S100A4 aus der Lunge im Vergleich zum Blut eine temporäre Assoziation mit Lungengewebe wiedergeben. Zudem konnte die Interaktion mit den Rezeptoren der Lungenzellen durch die Verabreichung glykierter Lipoproteine (glykLDL) als gut charakterisierte und spezifische RAGE-Liganden [179, 196] signifikant vermindert werden. Allerdings im Vergleich mit anderen S100-RAGE-Liganden unter physiologischen Bedingungen in der Ratte ist die Interaktion zwischen extrazellulärem ^{18}F -S100A4 und RAGE schwach bis moderat. So zeigen frühere PET-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit ^{18}F -S100A1 und ^{18}F -S100A12 unter anderem längere Retentionszeiten in der Lunge sowie eine höhere Abnahme der Lungenassoziation bei vorheriger Gabe von glykLDL [152, 196]. Glykierte Lipoproteine gehören zu den AGE-modifizierten Proteinen, die oft bei Diabetes und assoziierten Erkrankungen akkumulieren und als proinflammatorische Stimuli über AGE-Rezeptoren wie RAGE, CD36, SR-AI/II, SR-B1 und LOX-1 agieren [209, 218]. Insgesamt betrachtet scheinen *in vivo* für S100A4 neben RAGE noch andere, mit glykLDL-blockierbare Rezeptoren eine Rolle zu spielen. So wurden ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe neben RAGE verschiedene Scavenger-Rezeptoren wie SR-B1, SR-A, LOX-1 und CD36 in humanen Endothelzellen und Makrophagen nachgewiesen [179]. Dies könnte die relativ hohen Aufnahmeraten von ^{18}F -S100A4 in Milz, Leber und Nebenniere, hervorgerufen durch die Interaktion mit Scavenger-Rezeptoren auf Endothelzellen und sessilen Makrophagen in diesen Organen, erklären. In der Literatur wurde die konstitutive Synthese des Scavenger-Rezeptors MARCO in Marginalzonen-Makrophagen der Milz sowie die Klasse A der Scavenger-

Rezeptor-Familie (SR-AI/AII) und CD36 in Kupferzellen und in sinusoidalen Endothelzellen der Leber gezeigt [219, 220].

Bezüglich der RAGE-Bindung von ^{18}F -S100A4 *in vivo* sollte bedacht werden, dass unter physiologischen Bedingungen ebenso verschiedene endogene RAGE-Liganden vorhanden sind, die aufgrund höherer Konzentration und höherer Affinität zum RAGE-Rezeptor die Interaktion mit ^{18}F -S100A4 beeinträchtigen können.

Aus den Untersuchungen zur S100A4-RAGE-Interaktion in Zellen und im lebenden Organismus kann geschlussfolgert werden, dass für S100A4 neben RAGE noch andere Zelloberflächenrezeptoren in Frage kommen. In dieser Hinsicht können S100A4 und anderen S100-Proteine als „Multi-Rezeptoren-Liganden“ bezeichnet werden, wodurch sich auch die Beteiligung der S100-Proteine an einer Vielzahl zellulärer, physiologischer und pathophysiologischer Prozesse erklärt.

4.4 Bedeutung von S100A4 bei Metastasierungsprozessen des malignen Melanoms

4.4.1 Nachweis von S100A4 und RAGE in Melanomzellen

Für die Wahl eines geeigneten Zellmodells zur Untersuchung der Beteiligung von S100A4 und der S100A4-RAGE-Interaktion an Metastasierungsprozessen des malignen Melanoms wurden verschiedene Melanomzelllinien hinsichtlich ihrer S100A4- und RAGE-mRNA-Expression und -Proteinbiosynthese untersucht (vgl. 3.4). Zur Verfügung standen B16-F10-Mausmelanom-Zellen, die humane Melanomzelllinie A375 aus der Haut und die humane A2058-Zelllinie aus einer Lymphknotenmetastase eines malignen Melanoms sowie die aus einem humanen Primärtumor stammende Melanomzelllinie MEL-JUSO. Die einzelnen Zelllinien zeigten deutliche Unterschiede in der Genexpression und Proteinkonzentration von S100A4 bzw. RAGE. Vergleichbar mit Literaturberichten wiesen die A375- und A2058-Zellen die höchste S100A4-Proteinbiosynthese auf [221]. Im Gegensatz dazu ergaben die eigenen Untersuchungen, dass die MEL-JUSO-Melanomzelllinie eine äußerst geringe und die Mausmelanom-Zelllinie B16-F10 keine S100A4-Proteinbiosynthese aufweisen. Die Ergebnisse korrelieren zum Teil gut mit Literaturberichten, die eine hohe S100A4-Proteinkonzentration in Melanomzellen und anderen metastasierenden Tumorentitäten im Vergleich zu Primärzelllinien bzw. Zellen und Tumoren mit geringem metastatischem Potenzial belegen [17, 33, 89]. In dieser Hinsicht weichen jedoch die B16-F10-Zellen als stark metastasierende Zelllinie ab [222]. Die A375-Zelllinie ist entsprechend der

Literaturangabe aus einem malignen Melanom einer 54-jährigen Patientin etabliert worden, allerdings wurde dabei nicht erwähnt, ob die Tumorproben aus dem Primärtumor oder einer Metastase entnommen wurden [223]. In der vorliegenden Arbeit wurden die A375-Zellen aufgrund des zur Melanomzelllinie A2058 ähnlichen proliferativen Verhaltens den Zellmodellen aus einer Metastase zugeordnet.

Insgesamt betrachtet stimmen die Ergebnisse der Proteinbiosynthese gut mit der Expression der S100A4-mRNA in den verschiedenen Melanomzelllinien überein.

Des Weiteren wurde bei allen untersuchten Melanomzellen RAGE-Protein detektiert, allerdings wurde der Nachweis erst nach Verstärkung des Chemilumineszenzsignals möglich, so dass in den Zellen auf eine geringe RAGE-Proteinbiosynthese geschlossen werden kann. Im Vergleich zu S100A4 fiel die mRNA-Expression von RAGE deutlich geringer aus. In der Literatur ist die RAGE-Synthese sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene bei A375-Zellen belegt worden [178]. Eine weitere Studie mit humanen Melanomzelllinien zeigt ebenso die weitaus niedrigeren RAGE-Transkriptmengen im Vergleich zur S100A4-mRNA-Expression sowie die höhere RAGE-mRNA-Expression in der primären Melanomzelllinie im Vergleich zu Zellen eines sekundären Tumors bzw. einer Metastase [175]. Die zusätzlich detektierten, niedermolekularen RAGE-Proteinbanden zeigen verschiedene Glykosilierungszustände bzw. Isoformen des Rezeptors wie z. B. sRAGE bzw. RAGE_v1 [147].

Aufgrund des deutlichen Vorkommens von S100A4- und RAGE-Protein bei den A375-Melanomzellen wurden diese für die weitere Charakterisierung von S100A4 und der Interaktion zu RAGE beim malignen Melanom verwendet. Dazu erfolgte zunächst die stabile Transfektion der A375-Melanomzellen mit den klonierten humanen und murinen S100A4-pIRES2-AcGFP1-Plasmiden (vgl. 3.5.2). Für die Etablierung von Mausmodellen wurden die stabil transfizierten Zellen subkutan und intravenös in Nacktmäuse injiziert. Somit konnten mit den A375-mS100A4-Zellen spezies-spezifische Wirkungen des murinen S100A4-Proteins *in vivo* festgestellt werden.

4.4.2 Charakterisierung der stabil transfizierten A375-Melanomzellen

Die erfolgreiche stabile Transfektion der A375-Melanomzellen mit den verschiedenen klonierten Plasmiden (hS100A4-, mS100A4-pIRES2-AcGFP1) sowie der Vektor-kontrolle pIRES2-AcGFP1 wurde anhand der AcGFP1-Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop und im Durchflusszytometer nachgewiesen (vgl. 3.5.2). Die Heraufregulierung der S100A4-Proteinbiosynthese bei den A375-hS100A4- und A375-mS100A4-Zellen im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375- und den A375-mock-

Zellen wurde im Western Blot mit anschließender S100A4-Immundetektion nachgewiesen. Es wurden keine morphologischen Veränderungen bei den transfizierten A375-Melanomzellen durch die Heraufregulierung der S100A4-Proteinbiosynthese festgestellt.

In-vitro-Untersuchungen von Proliferation, Motilität, Adhäsion, Migration, Invasion

Um die Beteiligung von S100A4 an Metastasierungsprozessen des malignen Melanoms auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden wichtige Prozesse der Metastasierungskaskade *in vitro* näher betrachtet. Es erfolgte die Untersuchung von Proliferation, Motilität, Adhäsion, Migration und Invasion der A375-hS100A4- und A375-mS100A4-Zellen im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375- und A375-mock-Zellen. Anhand der hier gezeigten Daten wurde festgestellt, dass die A375-mock-Zellen sich bei einigen zellulären Eigenschaften von den nicht-transfizierten A375-Zellen unterscheiden. Allerdings konnte dafür bisher keine Erklärung in der Literatur gefunden werden.

Die Untersuchung der Zellproliferation der A375-hS100A4-, A375-mS100A4-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen A375-mock und A375 ergab, dass die A375-hS100A4-Zellen nach einem Untersuchungszeitraum von 120 Stunden am stärksten proliferierten (vgl. 3.6.1). Die ermittelten Verdopplungszeiten von 27 Stunden für die A375-hS100A4-Zellen bzw. ca. 32 Stunden für die A375-mS100A4-Zellen und ca. 34 Stunden für die A375 und A375-mock-Zellen spiegeln ebenfalls eine schnellere Wachstumsgeschwindigkeit der A375-hS100A4-Zellen wieder. In der Literatur ist für die A375-Zellen eine Verdopplungszeit von ca. 20,9 Stunden beschrieben [221]. Ein Grund für die abweichenden Wachstumsgeschwindigkeiten kann die genotypische Variabilität der in der jeweiligen Arbeitsgruppe verwendeten A375-Melanomzelllinie sein. So zeigten Widmer und Kollegen, dass die A375-Zellen in verschiedenen Forschungseinrichtungen inkonsistente Genexpressionsprofile aufwiesen [224].

Das Adhäsionsverhalten an Fibronektin war bei den A375-hS100A4-Zellen signifikant vermindert im Vergleich zu den Kontrollen A375 und A375-mock (vgl. 3.6.3). Die signifikante Reduktion des Adhäsionsverhaltens der A375-mS100A4 Zellen konnte nur gegenüber den A375-Zellen festgestellt werden. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte verminderte Adhäsionsfähigkeit von A375-hS100A4-Zellen an Fibronektin wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. So wurde bei zwei Forschungsarbeiten kein Zusammenhang zwischen der S100A4-Proteinkonzentration und der Adhäsionsfähigkeit an das Kunststoffsubstrat der Zellkulturschalen bzw. an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine festgestellt [225, 236].

Erste Untersuchungen zur Zellmotilität ergaben, dass innerhalb von zehn Stunden nach der Verwundung des Zellrasens vorwiegend nicht-transfizierte A375-Zellen in der Lage waren, sich in den zellfreien Raum zu bewegen, um den Spalt zu schließen (vgl. 3.6.2). Es folgten die A375-hS100A4-Zellen, deren relativer Wundbereich nach zehn Stunden ca. 17% größer war als bei den A375-Zellen. Die A375-mS100A4- und A375-mock-Zellen zeigten innerhalb dieses Zeitraumes die geringste Motilität um den Spalt zu schließen. Bezüglich des Versuchsaufbaus ist festzustellen, dass die Untersuchung der Zellbewegung in Zellkulturmedium mit 10% FKS (v/v) erfolgte und dabei neben der Motilität der Zellen, vermutlich ebenso die Proliferation der Zellen zur Verringerung des Spaltes beitrug. Aktuellste Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Motilität der A375- und A375-hS100A4-Zellen unter standardisierten Versuchsbedingungen belegen, dass nach 24 Stunden der Spalt der A375-hS100A4-Zellen signifikant kleiner war als der Spalt der nicht-transfizierten A375-Zellen. Hierbei wurden die Zellen während des gesamten Versuches in Kulturmedium mit 0,1% FKS (v/v) gehalten, so dass die Verringerung der Wunde allein durch die Bewegung der Zellen und nicht durch Proliferation zu Stande kam.

Die Analyse der stabil transfizierten Melanomzelllinien hinsichtlich der chemotaktisch induzierten Migration und Invasion entlang eines Konzentrationsgradienten von 0-10% FKS (v/v) ergab für die A375-hS100A4-Zellen ein signifikant gesteigertes Wanderungsverhalten im Vergleich zu den A375-mock- und den A375-Zellen (vgl. 3.6.4, 3.6.5). Bei diesem Versuchsaufbau migrieren die Zellen mit einer Größe von ca. 20-30 μm aktiv durch die Kapillarporenmembran (8 μm Porengröße) der Zellkultureinsätze. Zur Ermittlung der zellulären Invasionskapazität migrieren die Zellen zusätzlich durch eine ca. 2-3 mm dicke Matrigelschicht. Das Matrigel repräsentiert die Basalmembran der extrazellulären Matrix von Gewebe. Beide Wanderungsprozesse erfordern Zytoskelett-Veränderungen der Zellen. Die A375-hS100A4-Zellen zeigen ein signifikant gesteigertes Migrations- und Invasionsverhalten im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375-Melanomzellen und den A375-mock-Zellen. Das invasive Verhalten der A375-hS100A4-Zellen war ebenso gegenüber den A375-mS100A4-Zellen signifikant erhöht. Demzufolge wird aufgrund der heraufregulierten S100A4-Proteinbiosynthese bei den A375-hS100A4-Zellen eine Steigerung der migratorischen und insbesondere der invasiven Fähigkeiten bei den A375-Melanomzellen hervorgerufen.

In der Literatur wurde bei verschiedenen Zellsystemen, in denen die S100A4-Expression und -Synthese heraufreguliert bzw. inhibiert wurde, die daraus

resultierende Wirkung auf Zellproliferation, -motilität, -migration und -invasion gezeigt [54, 95, 109, 225-236]. In dieser Hinsicht wird der motilitätssteigernde Einfluss von S100A4 der Interaktion mit intrazellulären Proteinen wie nicht-muskuläres Tropomyosin und Myosin, Liprin $\beta 1$ und F-Aktin zugeschrieben [72, 91, 92, 95, 97, 98, 233]. Des Weiteren wird angenommen, dass die S100A4-vermittelte Steigerung der invasiven Kapazität bei verschiedenen Tumorzellen durch die Degradierung und Umgestaltung der extrazellulären Matrix zustande kommt und S100A4 dabei besonders bei der Heraufregulierung von Matrix-degradierenden Enzymen wie Matrix-Metalloproteinasen bzw. bei der Inhibierung von Proteaseinhibitoren eine Rolle spielt [107-109, 232]. Ebenso wurden regulatorische Proteine wie das Integrin $\alpha 6 \beta 4$, β -Catenin, Relaxin und der Tumorstromafaktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) entschlüsselt, welche direkt oder unter Beteiligung verschiedener Signalmoleküle die S100A4-Proteinbiosynthese erhöhen und dadurch zu einer Steigerung von Motilität, Migration und Invasion der Tumorzellen führen [226, 230, 237-239].

Zusammenfassend betrachtet führt die Heraufregulierung der Proteinbiosynthese von humanem S100A4 zu einer Steigerung des proliferierenden, migratorischen und invasiven Verhaltens der stabil transfizierten A375-hS100A4-Zellen. Die verminderte Adhäsionsfähigkeit der A375-hS100A4-Zellen verdeutlicht ebenso den metastasierenden Phänotyp der Zellen, da der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion Voraussetzung für invasiv wachsende, aus dem Primärtumorverband sich herauslösende Tumorzellen ist [240].

Nachweis der S100A4-Sekretion

Für die Untersuchung, inwiefern eine übermäßige, intrazelluläre S100A4-Proteinbiosynthese der stabil transfizierten A375-hS100A4 und A375-mS100A4-Zellen eine erhöhte Sekretion von S100A4 bedingt (vgl.3.6.6), wurden die Zellkulturüberstände der A375-hS100A4, A375-mS100A4-Zellen vergleichend zu den Kontrollen A375-mock und A375 mittels Western Blot und anschließender Immundetektion hinsichtlich ihrer extrazellulären S100A4-Konzentration analysiert (3.6.6). Die Signalstärken auf der Western-Blot-Membran zeigen eindeutig, dass die A375-hS100A4-Zellen eine hohe S100A4-Proteinkonzentration in das Zellkulturmedium abgeben. Im Vergleich dazu sezernieren die A375-mS100A4-Zellen deutlich weniger S100A4. Im Medium der nicht-transfizierten A375- und der A375-mock-Zellen wurde unter diesen Bedingungen kein bzw. kaum extrazelluläres S100A4 bestimmt. Da im Gesamtzelllysat der nicht-transfizierten A375-Zellen bereits S100A4-Protein

nachgewiesen wurde (vgl. 3.4, 3.5.2), ist wahrscheinlich die S100A4-Proteinmenge im Zellkulturmedium für die Detektion im Western Blot zu gering. Die Konzentrierung des Zellkulturüberstandes erbringt die für den proteinbiochemischen Nachweis notwendige S100A4-Konzentration (Dissertation Nadine Herwig, bisher unveröffentlichte Daten). Weiterhin erfolgte die Quantifizierung der extrazellulären S100A4-Proteinkonzentration mit dem *Circulex™ S100A4 ELISA Kit*, wobei die A375-hS100A4-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen und den A375-mS100A4-Zellen eine signifikant höhere S100A4-Konzentration in das umgebende Kulturmedium abgeben. Die geringere extrazelluläre S100A4-Proteinkonzentration der A375-mS100A4-Zellen liegt vermutlich an der humanen Spezifität des ELISA-Kits. Allerdings könnte aufgrund der deutlich schwächeren S100A4-Signalintensität bei der Western Blot-Analyse des A375-mS100A4-Zellüberstandes ebenso angenommen werden, dass die übermäßige intrazelluläre Produktion des murinen S100A4-Proteins nicht wie beim humanen Protein zu einer erhöhten Sekretion des Proteins führt. In der vorliegenden Arbeit sezernieren die A375-hS100A4-Zellen ca. 54 ng, die A375-mS100A4-Zellen ca. 32 ng und die Kontrollen ca. 18 ng (A375-mock) bzw. 13 ng (A375) S100A4 pro mg Gesamtprotein in das umgebende Zellkulturmedium. In der Literatur sind Angaben zu sezernierten S100A4-Proteinmengen vorwiegend für Patientenproben zu finden. Die S100A4-Konzentration in der Interstitialflüssigkeit von Brusttumoren wurde mit durchschnittlich 1.153 ng und im angrenzenden Normalgewebe mit ca. 445 ng S100A4 pro mg Gesamtprotein angegeben [83]. Ähnliche Proteinkonzentrationen wurden im Blutplasma von Patienten mit rheumatoider Arthritis (1.100 ng/ml) nachgewiesen, wobei die gesunde Kontrollgruppe eine S100A4-Konzentration von ca. 80 ng/ml aufwies. In der Gelenkflüssigkeit dieser Patienten wurden sogar S100A4-Werte über 1.980 ng/ml detektiert [85].

Wirkung der S100A4-Sekretion

In weiterführenden Experimenten wurde die Wirkung des extrazellulären S100A4-Proteins auf die Aktivierung des NF- κ B-p65-Transkriptionsfaktors und der RAGE-Proteinbiosynthese untersucht (vgl. 3.6.7). Dafür wurden die A375-Melanomzellen für 24 Stunden mit Zellkulturmedium der A375-hS100A4-Zellen inkubiert. Dies führte bei den A375-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität von p65 sowie zu einer deutlichen Steigerung der RAGE-Proteinbiosynthese. Ebenso zeigten die A375-hS100A4-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten A375-Zellen eine signifikant höhere DNA-Bindungsaktivität von p65 und eine höhere RAGE-Protein-

biosynthese. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Zugabe von rekombinantem S100A4-Protein tendenziell zu einer Erhöhung der RAGE-Proteinbiosynthese bei den nicht-transfizierten A375-Zellen führt (Daten nicht gezeigt). Demzufolge kann extrazelluläres S100A4 als positiver Regulator von RAGE und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B in autokriner bzw. parakriner Weise wirken. Die Aktivierung von NF- κ B, vermutlich über den klassischen NF- κ B-Aktivierungsweg durch rekombinantes S100A4 ist bereits in verschiedenen Zellsystemen beschrieben worden [77, 80, 107, 113, 115, 241]. Allerdings wurden dabei sowohl RAGE-abhängige als auch RAGE-unabhängige Aktivierungswege von NF- κ B und anderen pro-migratorischen Signalwegen durch S100A4 festgestellt [114, 115, 242]. Wiederum bei der Interaktion mit anderen RAGE-Liganden wie S100A12, AGEs, Amphoterin und Amyloid- β -Peptid ist die Aktivierung von NF- κ B das „Markenzeichen“ des RAGE-Rezeptors [120, 154, 243-245]. Bezüglich der vorliegenden Ergebnisse ist anzunehmen, dass aufgrund der Heraufregulierung der RAGE-Proteinbiosynthese durch extrazelluläres S100A4, der RAGE-Rezeptor in die S100A4-vermittelte NF- κ B-Aktivierung der A375- und A375-hS100A4-Melanomzellen involviert ist. Zudem wurde bereits die Heraufregulierung von RAGE und die Aktivierung von NF- κ B nach Inkubation mit rekombinantem S100A4-Protein gezeigt [246] und, dass die Bindung von RAGE-Liganden einen positiven Feedbackmechanismus auslöst, welcher zur Aktivierung der Genexpression und Synthese von RAGE führt [243, 247]. Das würde bedeuten, dass die erhöhte Menge an extrazellulärem S100A4-Protein die Heraufregulierung der RAGE-Synthese bedingt. Bezüglich der zellulären Bedeutung wird NF- κ B als ein wichtiger Regulator von Tumoraggressivität und -invasivität bei verschiedenen Krebserkrankungen, einschließlich des malignen Melanoms, angesehen [248, 249]. Ebenso beeinflusst die RAGE-Expression bzw. -Aktivierung zelluläre Proliferations-, Motilitäts-, Migrations- und Invasionsprozesse *in vitro* sowie Metastasierung *in vivo*, wobei angenommen wird, dass dafür die durch RAGE initiierten intrazellulären Signaltransduktionswege von p21^{ras}, verschiedener MAP-Kinasen und GTPasen sowie NF- κ B verantwortlich sind [121, 126, 150, 178, 250].

Die enorme Bedeutung von extrazellulärem S100A4 ist in Literaturberichten weitreichend belegt. Es wurde gezeigt, dass die Zugabe von rekombinantem (extrazellulärem) S100A4-Protein zur Stimulierung von Neuritenwachstum und -differenzierung [105], Bildung kapillarähnlicher Strukturen [74, 226] sowie zu einer gesteigerten Motilität, Migration und Invasivität bei verschiedenen Endothel-, Muskel- und Tumorzellen führt und in diese Prozesse Matrix-Metalloproteinasen involviert sind

[76, 78, 106, 107, 163, 190]. Zudem resultierte die Behandlung von Ovarialkarzinomzellen mit rekombinantem S100A4-Protein in einer erhöhten S100A4-mRNA-Expression und -Proteinbiosynthese, woraufhin die Autoren einen positiven Feedback-mechanismus bezüglich der S100A4-Expression vermuten [76]. Demzufolge würde die erhöhte Sekretion von S100A4 in einem autokrinen/parakrinen Wirkmechanismus zu der erhöhten intrazellulären S100A4-Proteinbiosynthese der A375-hS100A4-Zellen führen. Bezugnehmend auf die in der vorliegenden Arbeit festgestellte verminderte Adhäsionsfähigkeit der A375-hS100A4-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen könnte die recht kurze Inkubationszeit von 40 Minuten an Fibronektin ausschlaggebend für das Ergebnis sein. Demzufolge würde diese Zeitspanne nicht ausreichen, um genügend S100A4 für eine optimale Zellantwort zu sezernieren. Es wurde bereits gezeigt, dass S100A4 erst nach mehreren Stunden in das Zellkulturmedium sezerniert wird [34, 78, 251]. Ebenso wurden die hier gezeigten Effekte auf das migratorische und invasive Verhalten der A375-Zellen nach 24-stündiger Inkubationsdauer erreicht, wodurch genügend extrazelluläres S100A4 zur Auslösung der Zellantwort zur Verfügung stand. Daraus schlussfolgernd kann vermutet werden, dass die deutlich geringeren zellulären Effekte der A375-mS100A4-Zellen mit der geringeren S100A4-Sekretion in Zusammenhang stehen.

In-vivo-Untersuchungen

Abschließend wurde die Bedeutung von S100A4 unter In-vivo-Bedingungen untersucht, indem die A375-hS100A4-, A375-mS100A4-Zellen sowie die Kontrollzelllinien A375 und A375-mock subkutan bzw. intravenös in Nacktmäuse injiziert wurden (vgl. 3.6.8). Die subkutane Injektion der Zellen führte zur Entwicklung von Tumoren an der Implantationsstelle der Mäuse. Dabei wurde eindeutig festgestellt, dass die A375-hS100A4-Zellen zu signifikant größeren Tumoren heranwuchsen als die Tumore der übrigen Zelllinien. Demzufolge bestätigt sich die gesteigerte Zellproliferation der A375-hS100A4-Zellen *in vitro* ebenso unter In-vivo-Bedingungen als Xenotransplantat an Nacktmäusen. Die A375-mS100A4-Zellen zeigten hingegen ein ähnliches In-vivo-Wachstum wie die nicht-transfizierten A375-Melanomzellen. Eine Erklärung könnte wiederum die geringere S100A4-Sekretion der A375-mS100A4-Zellen im Vergleich zu den A375-hS100A4-Zellen sein.

Die fluoreszierenden Eigenschaften der stabil transfizierten A375-Melanomzellen ermöglichten die Visualisierung dieser Tumore mit dem KODAK *In-vivo-Imaging System FX-Pro*. Nach ca. drei Wochen wurden die Mäuse getötet und der Bauchraum

hinsichtlich makroskopischer Auffälligkeiten wie Metastasen bzw. Ansammlung fluoreszierender Zellen an wichtigen Organen sowohl visuell als auch mit dem KODAK *In-vivo-Imaging System FX-Pro* untersucht. Dabei wurden keine Veränderungen festgestellt.

Die Untersuchung der Nacktmäuse innerhalb von 16 Wochen nach intravenöser Injektion der A375- und stabil transfizierten A375-Melanomzellen ergab bis auf die Ausbildung von Tumoren an der Injektionsstelle am Schwanz, keine Auffälligkeiten, die auf die Entwicklung von Metastasen hindeuteten. Vergleichende Untersuchungen mit A375-Melanomzellen an athymischen Nacktmäusen (BALB/c) zeigten, dass die A375-Zellen ein recht geringes metastatisches Verhalten besitzen. Nach subkutaner Injektion von 5×10^5 Tumorzellen in 30 Tiere wurden nach acht Wochen keine Metastasen detektiert und die intravenöse Injektion von 8×10^5 Zellen führte im Mittel zu zwei bis drei Lungen-Metastasen. Die intravenöse Injektion der A375-Zellen in dieser Studie ergab ähnliche Resultate. Erst die von den wenigen Läsionen etablierten Zelllinien zeigten eine signifikant höhere metastatische Kapazität als die Eltern-Zelllinie [252]. Des Weiteren wurde die Ausbildung metastatischer Läsionen unter anderem an Leber und Lunge bei 89% der Tiere nach intravenöser Injektion von A375-Zellen in schwer immundefizienten NOG-Mäusen beschrieben [221]. NOG-Mäuse weisen multiple Immundefizienzen auf, wodurch Xenotransplantate leichter vom Versuchstier akzeptiert werden. In dieser Hinsicht kann diskutiert werden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten athymischen NMRI-*nu/nu*-Mäuse die injizierten Melanomzellen mit ihrem verbliebenem Immunsystem in Form von B- und NK-Zellen vernichtet haben und sich daher keine Metastasen im Tier entwickeln konnten. Des Weiteren registrierten Schmidt-Hansen et al. die Bildung metastatischer Läsionen vorwiegend in Lunge und Leber nach intravenöser Injektion von S100A4-transfizierten bzw. mit rekombinantem S100A4 behandelten murinen Adenokarzinomzellen in syngenesischen Mäusen [82]. Bei anderen Untersuchungen wurde vermutet, dass die S100A4-Proteinbiosynthese von Tumorzellen für Tumorstadium und Metastasierung nicht ausreicht, sondern erst das S100A4 der Stromazellen des umgebenden Gewebes die entscheidende Rolle bei der Stimulation von Tumorstadium und Metastasierung spielt [235].

In **Tabelle 4-1** sind die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wirkungen der heraufregulierten S100A4-Proteinbiosynthese auf metastasierungsrelevante Prozesse noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der untersuchten metastasierungsrelevanten Prozesse, die durch die Heraufregulierung der S100A4-Proteinbiosynthese gesteigert (↑) oder vermindert (↓) wurden.

Prozesse	Regulierung
Proliferation	↑
Motilität	↑
Adhäsion	↓
Migration	↑
Invasion	↑
S100A4-Sekretion	↑
RAGE-Proteinbiosynthese	↑
NF-κB-p65-Aktivierung	↑
Subkutanes Tumorwachstum <i>in vivo</i>	↑

Bezugnehmend auf die Schritte der Metastasierungskaskade (vgl. 1.1), ist anzunehmen, dass S100A4 bei fast allen Prozessen eine Rolle spielt. Die hier gezeigte gesteigerte Zellproliferation, Migration und Invasion der stabil mit humanem S100A4-transfizierten Melanomzellen kann bedeuten, dass Zellen mit einer hohen S100A4-Proteinbiosynthese und -Sekretion sowohl die stark proliferierenden Zellen im Primärtumor darstellen als auch zu den Zellen gehören, die anschließend das umliegende Gewebe invadieren bzw. die Blutgefäßkapillaren durchdringen und sich in der Zirkulation fortbewegen. Die verminderte Adhäsionsfähigkeit der A375-hS100A4-Zellen lässt vermuten, dass sich diese Zellen bevorzugt vom Primärtumor ablösen und in das umgebende Gewebe einwandern. Grum-Schwensen und Kollegen schlagen in ihrer Publikation vor, dass die Freisetzung von S100A4 im Primärtumor die Infiltration von T-Zellen und die Sekretion von Zytokinen stimuliert und somit eine Ereigniskette ausgelöst wird, die Tumorzellen dazu veranlasst zu metastasieren [253].

Bei der Extravasation in das Zielgewebe der metastasierenden Tumorzellen und der dortigen Proliferation spielen sicherlich wieder Zellen mit einer hohen S100A4-Proteinbiosynthese und -Sekretion eine bedeutende Rolle. Dafür sprechen erneut die Daten von Grum-Schwensen et al., die zeigen, dass bei der Ausbildung einer Metastase im Zielgewebe ähnliche Prozesse wie bei der Primärtumorentwicklung zum Tragen kommen und ein erhöhtes S100A4-Vorkommen zu einer Akkumulation von T-Zellen führt, wodurch ein geeignetes inflammatorisches Milieu für die Entwicklung einer Metastase geschaffen wird [253]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass S100A4-positive

Stromazellen, insbesondere Fibroblasten, die metastatische Kolonisation durch die Synthese von extrazellulären Matrix-Proteinen und die Sekretion von Wachstumsfaktoren vermitteln. Demzufolge scheint das S100A4 der Stromazellen für metastasierende Tumorzellen notwendig zu sein, um metastatische Läsionen an einer anderen Stelle im Körper zu bilden [254]. In diesem Zusammenhang zeigen Klingelhöfer und Kollegen mit einem spezifischen anti-S100A4-Antikörper die effiziente Unterdrückung der Metastasenentwicklung in einem murinen Xenotransplantat-Modell, höchstwahrscheinlich aufgrund der unterdrückten Invasion von Stromazellen zum wachsenden Primärtumor [255].

Anhand der Literaturberichte kann geschlussfolgert werden, dass neben dem S100A4-Protein der Tumorzellen auch das S100A4 der Stromazellen eine bedeutende Rolle beim Metastasierungsprozess spielt.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Gewinnung von rekombinantem S100A4-Protein und dessen Fluor-18-Radiomarkierung sowie die biochemische und radiopharmakologische Charakterisierung der Interaktion mit dem Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (RAGE) realisiert. Mit Hilfe der quantitativen Kleintier-PET-Untersuchung wurden Aussagen zum Metabolismus und möglichen biologischen Zielstrukturen von S100A4 *in vivo* getroffen. Dabei wurde deutlich, dass die S100A4-RAGE-Interaktion im Hinblick auf eine funktionelle Charakterisierung von RAGE aufgrund der niedrigen Affinität und der S100A4-Bindung an multiple Zielstrukturen weniger geeignet ist. Zum anderen wurde erstmals die bedeutende Rolle von S100A4 bei zellulären Metastasierungsprozessen des malignen Melanoms anhand von Untersuchungen mit stabil S100A4-transfizierten A375-Melanomzellen aufgezeigt. Dabei wurde festgestellt, dass die Melanomzellen aufgrund der erhöhten S100A4-Proteinbiosynthese und -Sekretion ein gesteigertes Proliferations-, Motilitäts-, Migrations- und Invasionsverhalten zeigen. Zudem ergaben die Untersuchungen, dass insbesondere das extrazelluläre S100A4-Protein die Aktivierung des NFκB-p65-Transkriptionsfaktors und die Heraufregulierung der RAGE-Proteinbiosynthese bewirkt. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist anzunehmen, dass das extrazelluläre S100A4-Protein die größere Bedeutung bei zellulären Prozessen der Metastasierungskaskade hat.

Die Hypothese, dass das S100A4-Protein und dessen Interaktion mit dem Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (RAGE) bei Metastasierungsprozessen des malignen Melanoms von zentraler Bedeutung sind, kann mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Aus den erzielten Ergebnissen lässt sich eine Reihe von Ansätzen für fortführende Untersuchungen ableiten:

- Die In-vitro- und In-vivo-Studien zeigen eine moderate bis schwache Affinität zwischen RAGE und dem rekombinanten S100A4- bzw. ^{18}F -S100A4-Protein. Zudem wurde deutlich, dass neben RAGE weitere spezifische S100A4-Oberflächenrezeptoren existieren, die es zu identifizieren gilt. Aufgrund der bisherigen Hinweise sollten dabei vordergründig Mitglieder der Scavenger-Rezeptorfamilie untersucht werden. Dies könnte beispielsweise mittels In-vitro-Bindungsstudien an Scavenger-Rezeptor-überexprimierenden Zellen erfolgen.
- Die heraufregulierte S100A4-Proteinbiosynthese und -Sekretion bei A375-hS100A4-Zellen führt zu deutlichen pro-metastatischen Effekten sowie zur Aktivierung von NF- κ B und RAGE. Die Stilllegung der S100A4-Genexpression mit Hilfe der RNA-Interferenz-Technologie in den A375-Zellen in Erwartung einer reziproken Zellantwort würde den Einfluss von S100A4 auf das Metastasierungsverhalten der A375-Melanomzellen weiter bekräftigen.
- Zur weiteren Abklärung der Beteiligung des extrazellulären S100A4-Proteins an den hier gezeigten zellulären Effekten könnten die zellulären Prozesse der Metastasierungskaskade mit A375-Zellen nach Behandlung mit Kulturmedium der A375-hS100A4-Zellen bzw. nach Inhibierung der S100A4-Sekretion untersucht werden. Dabei können sowohl verschiedene Inhibitoren von zellulären Sekretionswegen als auch die RNA-Interferenz-Technologie zum Einsatz kommen.
- Zur weiteren Charakterisierung der S100A4-RAGE-Interaktion bei der Metastasierungskaskade können die Zellprozesse in Anwesenheit von rekombinantem sRAGE im Hinblick auf eine verminderte zelluläre Aktivität, aufgrund des extrazellulären „Einfangs“ von S100A4 durch sRAGE, untersucht werden. Zusätzlich könnte die Stilllegung der Gen- und Proteinbiosynthese von RAGE bei A375-hS100A4-Zellen mit Hilfe der RNA-Interferenz-Technologie weitere Hinweise zur Beteiligung des Rezeptors bei Metastasierungsprozessen des malignen Melanoms bringen. Weiterführend könnte dabei untersucht werden, ob RAGE für die S100A4-vermittelte NF- κ B-Aktivierung notwendig ist.

- Die in Nacktmäuse subkutan injizierten A375-hS100A4-Melanomzellen entwickelten im Vergleich mit den anderen injizierten Zelllinien die größten subkutanen Tumore. Die intravenöse Injektion der A375-hS100A4-Melanomzellen führte zu keiner Entwicklung von Metastasen *in vivo*. Für die Generierung von metastatischen Läsionen mit den transfizierten A375-hS100A4-Melanomzellen im Versuchstier ist die Injektion der Zellen direkt ins Herz bzw. in ein bestimmtes Organ denkbar. In einem solchen Modellsystem könnte die pro-metastasierende Aktivität des humanen S100A4-Proteins beim malignen Melanom unter In-vivo-Bedingungen untersucht und weiter charakterisiert werden. Aufgrund der grün fluoreszierenden Eigenschaften der A375-hS100A4-Zellen wäre die Beobachtung der Metastasenentwicklung im Tiermodell mit Hilfe des KODAK *In-vivo-Imaging System FX-Pro* denkbar. Des Weiteren wäre eine solches Metastasierungsmodell für therapeutische Studien nutzbar.

Insgesamt betrachtet sollte generell geprüft werden, inwiefern S100A4 extrazellulär bzw. intrazellulär als Biomarker für das maligne Melanom in Frage kommt. Dafür können beispielsweise immunhistologische Untersuchungen an Tumorproben bzw. immunologische Untersuchungen an Serumproben von Patienten mit malignem Melanom erfolgen

Die weitere Charakterisierung von S100A4, RAGE und deren Interaktion mit Hilfe der vorgeschlagenen Ansätze wird weitere Erkenntnisse über die Entstehung von Metastasen und damit für die Entwicklung innovativer Therapieansätze bei metastasierenden Tumoren bringen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das S100A4-Protein ist für die Manifestierung eines metastatischen Phänotyps bei vielen Tumorarten von enormer Bedeutung. Die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen und der Interaktionspartner von S100A4 stellt daher einen vielsprechenden Forschungsansatz dar, um neue Erkenntnisse über das Verhalten von Tumorzellen während des Metastasierungsprozesses zu erhalten. Darauf aufbauend können neue Ansatzpunkte für die Therapie metastasierender Krebserkrankungen gewonnen werden. In dieser Hinsicht ist das bisher einer Therapie kaum zugängliche maligne Melanom als besonders aggressiver und frühzeitig metastasierender Tumor ein ideales Modell zur Aufklärung der zellulären und molekularen Prozesse, über die S100A4 seine Metastasen-fördernden Wirkungen ausübt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die biochemische und radiopharmakologische Charakterisierung der S100A4-RAGE-Interaktion sowie die Untersuchung der Beteiligung von S100A4 an Prozessen der Metastasierungskaskade *in vitro* und *in vivo*. Dies erforderte die Herstellung von rekombinantem S100A4-Protein und die Generierung von stabil mit S100A4-transfizierten Melanomzellen, die damit eine heraufregulierte S100A4-Proteinbiosynthese aufweisen.

Die Gewinnung von rekombinantem S100A4 in biologisch funktioneller Form unter Verwendung eines prokaryotischen Expressionssystems erfolgte mit einem Reinheitsgrad von ca. 92%. Das rekombinante S100A4-Protein wurde mit dem Aktivester *N*-Succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorbenzoat radioaktiv markiert und charakterisiert. Es wurde die Interaktion zwischen S100A4 bzw. ¹⁸F-markiertem S100A4 und der löslichen RAGE-Isoform sRAGE mit einer moderaten Bindungsaffinität im µM-Bereich nachgewiesen. Des Weiteren erfolgte erstmals die Analyse der radiopharmakologischen Eigenschaften von ¹⁸F-S100A4 mittels Untersuchungen zur zellulären Assoziation sowie zur metabolischen Stabilität, Bioverteilung und zu In-vivo-Interaktionen mittels Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie in der Ratte. Die In-vitro-Experimente wurden an Endothelzellen (HAEC) und an stabil mit RAGE-transfizierten A375-, A375-mock bzw. nicht transfizierten A375-Melanomzellen durchgeführt. Die A375-hRAGE-Zellen zeigten eine deutlich heraufregulierte RAGE-Proteinbiosynthese während die Endothelzellen eine vergleichsweise geringe intrazelluläre RAGE-Proteinkonzentration aufwiesen. Bei den Melanomzellen kann

aufgrund der höheren Assoziation von ^{18}F -S100A4 an A375-hRAGE-Zellen auf eine selektive Bindung von ^{18}F -S100A4 an RAGE-Rezeptoren auf der Zelloberfläche geschlossen werden. Die Assoziation von ^{18}F -S100A4 an Endothelzellen war bei 37°C in Gegenwart von nicht-markiertem rekombinantem S100A4 signifikant vermindert, dementsprechend findet eine spezifische Interaktion von ^{18}F -S100A4 mit Zelloberflächenrezeptoren der Endothelzellen statt. Dieses Ergebnis und die insgesamt höhere Bindung von ^{18}F -S100A4 an Endothelzellen im Vergleich zur Assoziation an Melanomzellen lassen neben RAGE noch andere Rezeptoren wie z. B. internalisierende Scavenger-Rezeptoren vermuten.

Die In-vivo-Stabilitätsuntersuchungen verdeutlichen einen proteolytischen Abbau von ^{18}F -S100A4, allerdings belegen das Vorhandensein von 67% intaktem ^{18}F -S100A4-Protein nach einer Stunde, die Stabilität von ^{18}F -S100A4 *in vivo*. Die Bioverteilungs- bzw. PET-Untersuchungen zeigen eine schnelle, innerhalb weniger Minuten stattfindende hohe Akkumulation in den Nieren und verdeutlichen somit die renale Ausscheidung von ^{18}F -S100A4. Die maßgeblichen Anreicherungen in Milz, Leber, Blut, Lunge und Nebennieren lassen Interaktionen mit Oberflächenrezeptoren dieser Gewebe erkennen. Die temporäre Retention von ^{18}F -S100A4 in der Lunge, dem Hauptsyntheseorgan von RAGE, und die verminderte ^{18}F -S100A4-Akkumulation in Gegenwart des spezifischen RAGE-Liganden glykLDL ist ein Hinweis dafür, dass S100A4 *in vivo* in der Lunge an RAGE bindet. Die Aktivitätsanreicherungen in Milz, Leber und Nebenniere deuten aufgrund der geringeren RAGE-Synthese in diesen Organen auf die Interaktion von ^{18}F -S100A4 mit anderen Zelloberflächenrezeptoren z. B. aus der Familie der Scavenger-Rezeptoren hin.

Die Beteiligung von S100A4 an Metastasierungsprozessen des malignen Melanoms wurde an stabil mit S100A4-transfizierten A375-Melanomzellen, die eine Heraufregulierung der humanen bzw. murinen S100A4-Proteinbiosynthese im Vergleich zu A375-mock- (Vektor-Kontrolle) und nicht-transfizierten A375-Zellen zeigen, untersucht. Die A375-hS100A4-Zellen sezernierten zudem eine signifikant höhere S100A4-Proteinkonzentration in das umgebende Zellkulturmedium im Vergleich zu den Kontrollen. In dieser Hinsicht konnte bei den A375-hS100A4-Zellen, vermutlich aufgrund der höheren extrazellulären S100A4-Konzentration, eine gesteigerte Proliferations-, Motilitäts-, Migrations- und Invasionsrate gegenüber den A375-mock- und A375-Zellen nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang stehen ebenso die gesteigerte RAGE-Proteinbiosynthese und die signifikant höhere Aktivität des Transkriptions-faktors NF- κ B bei A375-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit

Kulturmedium der A375-hS100A4-Zellen. Demnach wirkt vermutlich das extrazelluläre S100A4-Protein als autokriner bzw. parakriner Regulator von NF- κ B und RAGE.

Die subkutane Injektion der A375- und stabil transfizierten A375-Melanomzellen in Nacktmäuse führte zur Entwicklung subkutaner Tumore an der Injektionsstelle. Bereits zwei Wochen nach der Injektion etablierten die A375-hS100A4-Zellen die signifikant größeren Tumore im Vergleich zu den A375-mS100A4-, A375-mock und A375-Zellen. Nach Injektion der Zellen in die Schwanzvene der Nacktmäuse konnte keine Entwicklung von Metastasen im Tierkörper festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen:

- RAGE ist ein Rezeptor für das S100A4-Protein. Allerdings gibt es eindeutige Hinweise für weitere S100A4-Zielproteine an der Zelloberfläche.
- Die bedeutende Rolle von extrazellulärem S100A4 bei wichtigen zellulären Metastasierungsprozessen sowie bei der Aktivierung von Signalproteinen wie NF- κ B und RAGE beim malignen Melanom.

Die weitere Aufklärung der S100A4-spezifischen Signalkaskaden und Rezeptoren bei metastasierenden Tumorerkrankungen sowie die Charakterisierung von S100A4 als klinischen Parameter bei Patienten mit malignem Melanom stellen hoch interessante Aspekte in der Krebsforschung dar.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3** (2003) 453-8.
- [2] Steeg, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* **12** (2006) 895-904.
- [3] Spano, D.; Heck, C.; De Antonellis, P.; Christofori, G.; Zollo, M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* **22** (2012) 234-49.
- [4] Talmadge, J. E.; Fidler, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* **70** (2010) 5649-69.
- [5] Langley, R. R.; Fidler, I. J. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev* **28** (2007) 297-321.
- [6] Folkman, J. How Is Blood Vessel Growth Regulated in Normal and Neoplastic Tissue?—G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* **46** (1986) 467-73.
- [7] Liotta, L. A. Tumor Invasion and Metastases—Role of the Extracellular Matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res* **46** (1986) 1-7.
- [8] Fidler, I. J. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* **45** (1970) 773-82.
- [9] Nicolson, G. L. Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **948** (1988) 175-224.
- [10] Santamaria-Kisiel, L.; Rintala-Dempsey, A. C.; Shaw, G. S. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J* **396** (2006) 201-14.
- [11] Moore, B. W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **19** (1965) 739-44.
- [12] Isobe, T.; Okuyama, T. The amino-acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S-100a protein. *Eur J Biochem* **116** (1981) 79-86.
- [13] Schafer, B. W.; Wicki, R.; Engelkamp, D.; Mattei, M. G.; Heizmann, C. W. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* **25** (1995) 638-43.
- [14] Ravasi, T.; Hsu, K.; Goyette, J.; Schroder, K.; Yang, Z.; Rahimi, F.; Miranda, L. P.; Alewood, P. F.; Hume, D. A.; Geczy, C. Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. *Genomics* **84** (2004) 10-22.
- [15] Donato, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* **60** (2003) 540-51.
- [16] Marenholz, I.; Heizmann, C. W.; Fritz, G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* **322** (2004) 1111-22.

- [17] Garrett, S. C.; Varney, K. M.; Weber, D. J.; Bresnick, A. R. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* **281** (2006) 677-80.
- [18] Garrett, S. C.; Hodgson, L.; Rybin, A.; Toutchkine, A.; Hahn, K. M.; Lawrence, D. S.; Bresnick, A. R. A biosensor of S100A4 metastasis factor activation: inhibitor screening and cellular activation dynamics. *Biochemistry* **47** (2008) 986-96.
- [19] Malashkevich, V. N.; Varney, K. M.; Garrett, S. C.; Wilder, P. T.; Knight, D.; Charpentier, T. H.; Ramagopal, U. A.; Almo, S. C.; Weber, D. J.; Bresnick, A. R. Structure of Ca²⁺-bound S100A4 and its interaction with peptides derived from nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry* **47** (2008) 5111-26.
- [20] Pedrocchi, M.; Schafer, B. W.; Durussel, I.; Cox, J. A.; Heizmann, C. W. Purification and characterization of the recombinant human calcium-binding S100 proteins CAPL and CACY. *Biochemistry* **33** (1994) 6732-8.
- [21] Eckert, R. L.; Broome, A. M.; Ruse, M.; Robinson, N.; Ryan, D.; Lee, K. S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol* **123** (2004) 23-33.
- [22] Vallely, K. M.; Rustandi, R. R.; Ellis, K. C.; Varlamova, O.; Bresnick, A. R.; Weber, D. J. Solution structure of human Mts1 (S100A4) as determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **41** (2002) 12670-80.
- [23] Sherbet, G. V. S100A4 (S100 calcium binding protein A4). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* (2011).
- [24] Dukhanina, E. A.; Dukhanin, A. S.; Lomonosov, M. Y.; Lukanidin, E. M.; Georgiev, G. P. Spectral studies on the calcium-binding properties of Mts1 protein and its interaction with target protein. *FEBS Lett* **410** (1997) 403-6.
- [25] Pathuri, P.; Vogeley, L.; Luecke, H. Crystal structure of metastasis-associated protein S100A4 in the active calcium-bound form. *J Mol Biol* **383** (2008) 62-77.
- [26] Gingras, A. R.; Basran, J.; Prescott, A.; Kriajevska, M.; Bagshaw, C. R.; Barsukov, I. L. Crystal structure of the Ca(2⁺)-form and Ca(2⁺)-binding kinetics of metastasis-associated protein, S100A4. *FEBS Lett* **582** (2008) 1651-6.
- [27] Barraclough, R.; Dawson, K. J.; Rudland, P. S. Control of protein synthesis in cuboidal rat mammary epithelial cells in culture. Changes in gene expression accompany the formation of elongated cells. *Eur J Biochem* **129** (1982) 335-41.
- [28] Barraclough, R.; Savin, J.; Dube, S. K.; Rudland, P. S. Molecular cloning and sequence of the gene for p9Ka. A cultured myoepithelial cell protein with strong homology to S-100, a calcium-binding protein. *J Mol Biol* **198** (1987) 13-20.
- [29] Linzer, D. I.; Nathans, D. Growth-related changes in specific mRNAs of cultured mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80** (1983) 4271-5.
- [30] Jackson-Grusby, L. L.; Swiergiel, J.; Linzer, D. I. A growth-related mRNA in cultured mouse cells encodes a placental calcium binding protein. *Nucleic Acids Res* **15** (1987) 6677-90.
- [31] Goto, K.; Endo, H.; Fujiyoshi, T. Cloning of the sequences expressed abundantly in established cell lines: identification of a cDNA clone highly homologous to S-100, a calcium binding protein. *J Biochem* **103** (1988) 48-53.

- [32] Masiakowski, P.; Shooter, E. M. Nerve growth factor induces the genes for two proteins related to a family of calcium-binding proteins in PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (1988) 1277-81.
- [33] Ebralidze, A.; Tulchinsky, E.; Grigorian, M.; Afanasyeva, A.; Senin, V.; Revazova, E.; Lukanidin, E. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev* **3** (1989) 1086-93.
- [34] Watanabe, Y.; Kobayashi, R.; Ishikawa, T.; Hidaka, H. Isolation and characterization of a calcium-binding protein derived from mRNA termed p9Ka, pEL-98, 18A2, or 42A by the newly synthesized vasorelaxant W-66 affinity chromatography. *Arch Biochem Biophys* **292** (1992) 563-9.
- [35] Engelkamp, D.; Schafer, B. W.; Erne, P.; Heizmann, C. W. S100 alpha, CAPL, and CACY: molecular cloning and expression analysis of three calcium-binding proteins from human heart. *Biochemistry* **31** (1992) 10258-64.
- [36] Strutz, F.; Okada, H.; Lo, C. W.; Danoff, T.; Carone, R. L.; Tomaszewski, J. E.; Neilson, E. G. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* **130** (1995) 393-405.
- [37] De Vouge, M. W.; Mukherjee, B. B. Transformation of normal rat kidney cells by v-K-ras enhances expression of transin 2 and an S-100-related calcium-binding protein. *Oncogene* **7** (1992) 109-19.
- [38] Takenaga, K.; Nakamura, Y.; Endo, H.; Sakiyama, S. Involvement of S100-related calcium-binding protein pEL98 (or mts1) in cell motility and tumor cell invasion. *Jpn J Cancer Res* **85** (1994) 831-9.
- [39] Nikitenko, L. L.; Lloyd, B. H.; Rudland, P. S.; Fear, S.; Barraclough, R. Localisation by in situ hybridisation of S100A4 (p9Ka) mRNA in primary human breast tumour specimens. *Int J Cancer* **86** (2000) 219-28.
- [40] Pedersen, K. B.; Nesland, J. M.; Fodstad, O.; Maelandsmo, G. M. Expression of S100A4, E-cadherin, alpha- and beta-catenin in breast cancer biopsies. *Br J Cancer* **87** (2002) 1281-6.
- [41] Rosty, C.; Ueki, T.; Argani, P.; Jansen, M.; Yeo, C. J.; Cameron, J. L.; Hruban, R. H.; Goggins, M. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol* **160** (2002) 45-50.
- [42] Gupta, S.; Hussain, T.; MacLennan, G. T.; Fu, P.; Patel, J.; Mukhtar, H. Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma. *J Clin Oncol* **21** (2003) 106-12.
- [43] Nakamura, T.; Ajiki, T.; Murao, S.; Kamigaki, T.; Maeda, S.; Ku, Y.; Kuroda, Y. Prognostic significance of S100A4 expression in gallbladder cancer. *Int J Oncol* **20** (2002) 937-41.
- [44] Ninomiya, I.; Ohta, T.; Fushida, S.; Endo, Y.; Hashimoto, T.; Yagi, M.; Fujimura, T.; Nishimura, G.; Tani, T.; Shimizu, K.; Yonemura, Y.; Heizmann, C. W.; Schafer, B. W.; Sasaki, T.; Miwa, K. Increased expression of S100A4 and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* **18** (2001) 715-20.

- [45] Yonemura, Y.; Endou, Y.; Kimura, K.; Fushida, S.; Bandou, E.; Taniguchi, K.; Kinoshita, K.; Ninomiya, I.; Sugiyama, K.; Heizmann, C. W.; Schafer, B. W.; Sasaki, T. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin Cancer Res* **6** (2000) 4234-42.
- [46] Wang, Y. Y.; Ye, Z. Y.; Zhao, Z. S.; Tao, H. Q.; Chu, Y. Q. High-level expression of S100A4 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **17** (2010) 89-97.
- [47] Cho, Y. G.; Kim, C. J.; Nam, S. W.; Yoon, S. H.; Lee, S. H.; Yoo, N. J.; Lee, J. Y.; Park, W. S. Overexpression of S100A4 is closely associated with progression of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **11** (2005) 4852-6.
- [48] Kim, J. H.; Kim, C. N.; Kim, S. Y.; Lee, J. S.; Cho, D.; Kim, J. W.; Yoon, S. Y. Enhanced S100A4 protein expression is clinicopathologically significant to metastatic potential and p53 dysfunction in colorectal cancer. *Oncol Rep* **22** (2009) 41-7.
- [49] Kimura, K.; Endo, Y.; Yonemura, Y.; Heizmann, C. W.; Schafer, B. W.; Watanabe, Y.; Sasaki, T. Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* **16** (2000) 1125-31.
- [50] Zou, M.; Al-Baradie, R. S.; Al-Hindi, H.; Farid, N. R.; Shi, Y. S100A4 (Mts1) gene overexpression is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* **93** (2005) 1277-84.
- [51] Davies, B. R.; Davies, M. P.; Gibbs, F. E.; Barraclough, R.; Rudland, P. S. Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1. *Oncogene* **8** (1993) 999-1008.
- [52] Grigorian, M.; Ambartsumian, N.; Lykkesfeldt, A. E.; Bastholm, L.; Elling, F.; Georgiev, G.; Lukanidin, E. Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells. *Int J Cancer* **67** (1996) 831-41.
- [53] Maelandsmo, G. M.; Hovig, E.; Skrede, M.; Engebraaten, O.; Florenes, V. A.; Myklebost, O.; Grigorian, M.; Lukanidin, E.; Scanlon, K. J.; Fodstad, O. Reversal of the in vivo metastatic phenotype of human tumor cells by an anti-CAPL (mts1) ribozyme. *Cancer Res* **56** (1996) 5490-8.
- [54] Takenaga, K.; Nakamura, Y.; Sakiyama, S. Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells. *Oncogene* **14** (1997) 331-7.
- [55] Ambartsumian, N. S.; Grigorian, M. S.; Larsen, I. F.; Karlstrom, O.; Sidenius, N.; Rygaard, J.; Georgiev, G.; Lukanidin, E. Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene. *Oncogene* **13** (1996) 1621-30.
- [56] Davies, M. P.; Rudland, P. S.; Robertson, L.; Parry, E. W.; Jolicoeur, P.; Barraclough, R. Expression of the calcium-binding protein S100A4 (p9Ka) in MMTV-neu transgenic mice induces metastasis of mammary tumours. *Oncogene* **13** (1996) 1631-7.
- [57] Rudland, P. S.; Platt-Higgins, A.; Renshaw, C.; West, C. R.; Winstanley, J. H.; Robertson, L.; Barraclough, R. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res* **60** (2000) 1595-603.
- [58] Ismail, N. I.; Kaur, G.; Hashim, H.; Hassan, M. S. S100A4 overexpression proves to be independent marker for breast cancer progression. *Cancer Cell Int* **8** (2008) 12.

- [59] Platt-Higgins, A. M.; Renshaw, C. A.; West, C. R.; Winstanley, J. H.; De Silva Rudland, S.; Barraclough, R.; Rudland, P. S. Comparison of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9ka) with other prognostic markers in human breast cancer. *Int J Cancer* **89** (2000) 198-208.
- [60] Stein, U.; Burock, S.; Herrmann, P.; Wendler, I.; Niederstrasser, M.; Wernecke, K. D.; Schlag, P. M. Diagnostic and prognostic value of metastasis inducer S100A4 transcripts in plasma of colon, rectal, and gastric cancer patients. *J Mol Diagn* **13** (2011) 189-98.
- [61] Andersen, K.; Nesland, J. M.; Holm, R.; Florenes, V. A.; Fodstad, O.; Maelandsmo, G. M. Expression of S100A4 combined with reduced E-cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma. *Mod Pathol* **17** (2004) 990-7.
- [62] Matsubara, D.; Niki, T.; Ishikawa, S.; Goto, A.; Ohara, E.; Yokomizo, T.; Heizmann, C. W.; Aburatani, H.; Moriyama, S.; Moriyama, H.; Nishimura, Y.; Funata, N.; Fukayama, M. Differential expression of S100A2 and S100A4 in lung adenocarcinomas: clinicopathological significance, relationship to p53 and identification of their target genes. *Cancer Sci* **96** (2005) 844-57.
- [63] Kwon, Y. W.; Chang, I. H.; Kim, K. D.; Kim, Y. S.; Myung, S. C.; Kim, M. K.; Kim, T. H. Significance of S100A2 and S100A4 Expression in the Progression of Prostate Adenocarcinoma. *Korean J Urol* **51** (2010) 456-62.
- [64] Davies, B. R.; O'Donnell, M.; Durkan, G. C.; Rudland, P. S.; Barraclough, R.; Neal, D. E.; Mellon, J. K. Expression of S100A4 protein is associated with metastasis and reduced survival in human bladder cancer. *J Pathol* **196** (2002) 292-9.
- [65] Agerbaek, M.; Alsner, J.; Marcussen, N.; Lundbeck, F.; Von der Maase, H. Focal S100A4 protein expression is an independent predictor of development of metastatic disease in cystectomized bladder cancer patients. *Eur Urol* **50** (2006) 777-85.
- [66] Gongoll, S.; Peters, G.; Mengel, M.; Piso, P.; Klemphauer, J.; Kreipe, H.; von Waselewski, R. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology* **123** (2002) 1478-84.
- [67] Wang, H. Y.; Zhang, J. Y.; Cui, J. T.; Tan, X. H.; Li, W. M.; Gu, J.; Lu, Y. Y. Expression status of S100A14 and S100A4 correlates with metastatic potential and clinical outcome in colorectal cancer after surgery. *Oncol Rep* **23** (2010) 45-52.
- [68] Hemandas, A. K.; Salto-Tellez, M.; Maricar, S. H.; Leong, A. F.; Leow, C. K. Metastasis-associated protein S100A4--a potential prognostic marker for colorectal cancer. *J Surg Oncol* **93** (2006) 498-503.
- [69] Bandiera, A.; Melloni, G.; Freschi, M.; Giovanardi, M.; Carretta, A.; Borri, A.; Ciriaco, P.; Zannini, P. Prognostic factors and analysis of S100a4 protein in resected pulmonary metastases from renal cell carcinoma. *World J Surg* **33** (2009) 1414-20.
- [70] Oida, Y.; Yamazaki, H.; Tobita, K.; Mukai, M.; Ohtani, Y.; Miyazaki, N.; Abe, Y.; Imaizumi, T.; Makuuchi, H.; Ueyama, Y.; Nakamura, M. Increased S100A4 expression combined with decreased E-cadherin expression predicts a poor outcome of patients with pancreatic cancer. *Oncol Rep* **16** (2006) 457-63.
- [71] Ikenaga, N.; Ohuchida, K.; Mizumoto, K.; Yu, J.; Fujita, H.; Nakata, K.; Ueda, J.; Sato, N.; Nagai, E.; Tanaka, M. S100A4 mRNA is a diagnostic and prognostic marker in pancreatic carcinoma. *J Gastrointest Surg* **13** (2009) 1852-8.

- [72] Takenaga, K.; Nakamura, Y.; Sakiyama, S.; Hasegawa, Y.; Sato, K.; Endo, H. Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin. *J Cell Biol* **124** (1994) 757-68.
- [73] Mandinova, A.; Atar, D.; Schafer, B. W.; Spiess, M.; Aebi, U.; Heizmann, C. W. Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium. *J Cell Sci* **111** (1998) 2043-54.
- [74] Semov, A.; Moreno, M. J.; Onichtchenko, A.; Abulrob, A.; Ball, M.; Ekiel, I.; Pietrzynski, G.; Stanimirovic, D.; Alakhov, V. Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* **280** (2005) 20833-41.
- [75] Flatmark, K.; Pedersen, K. B.; Nesland, J. M.; Rasmussen, H.; Aamodt, G.; Mikalsen, S. O.; Bjørnland, K.; Fodstad, O.; Maelandsmo, G. M. Nuclear localization of the metastasis-related protein S100A4 correlates with tumour stage in colorectal cancer. *J Pathol* **200** (2003) 589-95.
- [76] Kikuchi, N.; Horiuchi, A.; Osada, R.; Imai, T.; Wang, C.; Chen, X.; Konishi, I. Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci* **97** (2006) 1061-9.
- [77] Hsieh, H. L.; Schafer, B. W.; Weigle, B.; Heizmann, C. W. S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **316** (2004) 949-59.
- [78] Ambartsumian, N.; Klingelhofer, J.; Grigorian, M.; Christensen, C.; Kriajevska, M.; Tulchinsky, E.; Georgiev, G.; Berezin, V.; Bock, E.; Rygaard, J.; Cao, R. H.; Cao, Y. H.; Lukanidin, E. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* **20** (2001) 4685-95.
- [79] Gibbs, F. E.; Barraclough, R.; Platt-Higgins, A.; Rudland, P. S.; Wilkinson, M. C.; Parry, E. W. Immunocytochemical distribution of the calcium-binding protein p9Ka in normal rat tissues: variation in the cellular location in different tissues. *J Histochem Cytochem* **43** (1995) 169-80.
- [80] Pedersen, K. B.; Andersen, K.; Fodstad, O.; Maelandsmo, G. M. Sensitization of interferon-gamma induced apoptosis in human osteosarcoma cells by extracellular S100A4. *BMC Cancer* **4** (2004) 52.
- [81] Duarte, W. R.; Iimura, T.; Takenaga, K.; Ohya, K.; Ishikawa, I.; Kasugai, S. Extracellular role of S100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament. *Biochem Biophys Res Commun* **255** (1999) 416-20.
- [82] Schmidt-Hansen, B.; Klingelhofer, J.; Grum-Schwensen, B.; Christensen, A.; Andresen, S.; Kruse, C.; Hansen, T.; Ambartsumian, N.; Lukanidin, E.; Grigorian, M. Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay. *J Biol Chem* **279** (2004) 24498-504.
- [83] Cabezon, T.; Celis, J. E.; Skibshøj, I.; Klingelhofer, J.; Grigorian, M.; Gromov, P.; Rank, F.; Myklebust, J. H.; Maelandsmo, G. M.; Lukanidin, E.; Ambartsumian, N. Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer. *Int J Cancer* **121** (2007) 1433-44.

- [84] Watanabe, Y.; Usuda, N.; Tsugane, S.; Kobayashi, R.; Hidaka, H. Calvasculin, an encoded protein from mRNA termed pEL-98, 18A2, 42A, or p9Ka, is secreted by smooth muscle cells in culture and exhibits Ca(2+)-dependent binding to 36-kDa microfibril-associated glycoprotein. *J Biol Chem* **267** (1992) 17136-40.
- [85] Klingelhofer, J.; Senolt, L.; Baslund, B.; Nielsen, G. H.; Skibshoj, I.; Pavelka, K.; Neidhart, M.; Gay, S.; Ambartsumian, N.; Hansen, B. S.; Petersen, J.; Lukanidin, E.; Grigorian, M. Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **56** (2007) 779-89.
- [86] Grigorian, M. S.; Tulchinsky, E. M.; Zain, S.; Ebralidze, A. K.; Kramerov, D. A.; Kriajevska, M. V.; Georgiev, G. P.; Lukanidin, E. M. The mts1 gene and control of tumor metastasis. *Gene* **135** (1993) 229-38.
- [87] Takenaga, K.; Nakamura, Y.; Sakiyama, S. Cellular localization of pEL98 protein, an S100-related calcium binding protein, in fibroblasts and its tissue distribution analyzed by monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct* **19** (1994) 133-41.
- [88] Takenaga, K.; Nakamura, Y.; Sakiyama, S. Expression of a calcium binding protein pEL98 (mts1) during differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **202** (1994) 94-101.
- [89] Maeldandsmo, G. M.; Florenes, V. A.; Mellingsaeter, T.; Hovig, E.; Kerbel, R. S.; Fodstad, O. Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int J Cancer* **74** (1997) 464-9.
- [90] Klingelhofer, J.; Ambartsumian, N. S.; Lukanidin, E. M. Expression of the metastasis-associated mts1 gene during mouse development. *Dev Dyn* **210** (1997) 87-95.
- [91] Watanabe, Y.; Usada, N.; Minami, H.; Morita, T.; Tsugane, S.; Ishikawa, R.; Kohama, K.; Tomida, Y.; Hidaka, H. Calvasculin, as a factor affecting the microfilament assemblies in rat fibroblasts transfected by src gene. *FEBS Letters* **324** (1993) 51-55.
- [92] Kriajevska, M. V.; Cardenas, M. N.; Grigorian, M. S.; Ambartsumian, N. S.; Georgiev, G. P.; Lukanidin, E. M. Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. *J Biol Chem* **269** (1994) 19679-82.
- [93] Kriajevska, M.; Tarabykina, S.; Bronstein, I.; Maitland, N.; Lomonosov, M.; Hansen, K.; Georgiev, G.; Lukanidin, E. Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein modulates protein kinase C phosphorylation of the heavy chain of nonmuscle myosin. *J Biol Chem* **273** (1998) 9852-6.
- [94] Li, Z. H.; Spektor, A.; Varlamova, O.; Bresnick, A. R. Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry* **42** (2003) 14258-66.
- [95] Li, Z. H.; Bresnick, A. R. The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer Res* **66** (2006) 5173-80.
- [96] Dulyaninova, N. G.; Malashkevich, V. N.; Almo, S. C.; Bresnick, A. R. Regulation of myosin-IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry* **44** (2005) 6867-76.
- [97] Ford, H. L.; Zain, S. B. Interaction of metastasis associated Mts1 protein with nonmuscle myosin. *Oncogene* **10** (1995) 1597-605.

- [98] Kriajevska, M.; Fischer-Larsen, M.; Moertz, E.; Vorm, O.; Tulchinsky, E.; Grigorian, M.; Ambartsumian, N.; Lukanidin, E. Liprin beta 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J Biol Chem* **277** (2002) 5229-35.
- [99] Grigorian, M.; Andresen, S.; Tulchinsky, E.; Kriajevska, M.; Carlberg, C.; Kruse, C.; Cohn, M.; Ambartsumian, N.; Christensen, A.; Selivanova, G.; Lukanidin, E. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* **276** (2001) 22699-708.
- [100] Berge, G.; Maelandsmo, G. M. Evaluation of potential interactions between the metastasis-associated protein S100A4 and the tumor suppressor protein p53. *Amino Acids* **41** (2011) 863-73.
- [101] Wang, G.; Rudland, P. S.; White, M. R.; Barraclough, R. Interaction in vivo and in vitro of the metastasis-inducing S100 protein, S100A4 (p9Ka) with S100A1. *J Biol Chem* **275** (2000) 11141-6.
- [102] Endo, H.; Takenaga, K.; Kanno, T.; Satoh, H.; Mori, S. Methionine aminopeptidase 2 is a new target for the metastasis-associated protein, S100A4. *J Biol Chem* **277** (2002) 26396-402.
- [103] Li, C. L.; Martinez, V.; He, B.; Lombet, A.; Perbal, B. A role for CCN3 (NOV) in calcium signalling. *Mol Pathol* **55** (2002) 250-61.
- [104] Chen, H.; Fernig, D. G.; Rudland, P. S.; Sparks, A.; Wilkinson, M. C.; Barraclough, R. Binding to intracellular targets of the metastasis-inducing protein, S100A4 (p9Ka). *Biochem Biophys Res Commun* **286** (2001) 1212-7.
- [105] Novitskaya, V.; Grigorian, M.; Kriajevska, M.; Tarabykina, S.; Bronstein, I.; Berezin, V.; Bock, E.; Lukanidin, E. Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem* **275** (2000) 41278-86.
- [106] Belot, N.; Pochet, R.; Heizmann, C. W.; Kiss, R.; Decaestecker, C. Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* **1600** (2002) 74-83.
- [107] Schmidt-Hansen, B.; Ornas, D.; Grigorian, M.; Klingelhofer, J.; Tulchinsky, E.; Lukanidin, E.; Ambartsumian, N. Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* **23** (2004) 5487-95.
- [108] Bjornland, K.; Winberg, J. O.; Odegaard, O. T.; Hovig, E.; Loennechen, T.; Aasen, A. O.; Fodstad, O.; Maelandsmo, G. M. S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme. *Cancer Res* **59** (1999) 4702-8.
- [109] Saleem, M.; Kweon, M. H.; Johnson, J. J.; Adhami, V. M.; Elcheva, I.; Khan, N.; Bin Hafeez, B.; Bhat, K. M.; Sarfaraz, S.; Reagan-Shaw, S.; Spiegelman, V. S.; Setaluri, V.; Mukhtar, H. S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (2006) 14825-30.

- [110] Mathisen, B.; Lindstad, R. I.; Hansen, J.; El-Gewely, S. A.; Maelandsmo, G. M.; Hovig, E.; Fodstad, O.; Loennechen, T.; Winberg, J. O. S100A4 regulates membrane induced activation of matrix metalloproteinase-2 in osteosarcoma cells. *Clin Exp Metastasis* **20** (2003) 701-11.
- [111] Senolt, L.; Grigorian, M.; Lukanidin, E.; Simmen, B.; Michel, B. A.; Pavelka, K.; Gay, R. E.; Gay, S.; Neidhart, M. S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis* **65** (2006) 1645-8.
- [112] Oslejskova, L.; Grigorian, M.; Gay, S.; Neidhart, M.; Senolt, L. The metastasis associated protein S100A4: a potential novel link to inflammation and consequent aggressive behaviour of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* **67** (2008) 1499-504.
- [113] Boye, K.; Grotterod, I.; Aasheim, H. C.; Hovig, E.; Maelandsmo, G. M. Activation of NF-kappaB by extracellular S100A4: analysis of signal transduction mechanisms and identification of target genes. *Int J Cancer* **123** (2008) 1301-10.
- [114] Grotterod, I.; Maelandsmo, G. M.; Boye, K. Signal transduction mechanisms involved in S100A4-induced activation of the transcription factor NF-kappaB. *BMC Cancer* **10** (2010) 241.
- [115] Yammani, R. R.; Carlson, C. S.; Bresnick, A. R.; Loeser, R. F. Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products. *Arthritis Rheum* **54** (2006) 2901-11.
- [116] Kiryushko, D.; Novitskaya, V.; Soroka, V.; Klingelhofer, J.; Lukanidin, E.; Berezin, V.; Bock, E. Molecular mechanisms of Ca^{2+} signaling in neurons induced by the S100A4 protein. *Mol Cell Biol* **26** (2006) 3625-38.
- [117] Schmidt, A. M.; Vianna, M.; Gerlach, M.; Brett, J.; Ryan, J.; Kao, J.; Esposito, C.; Hegarty, H.; Hurley, W.; Clauss, M. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* **267** (1992) 14987-97.
- [118] Neeper, M.; Schmidt, A. M.; Brett, J.; Yan, S. D.; Wang, F.; Pan, Y. C.; Elliston, K.; Stern, D.; Shaw, A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* **267** (1992) 14998-5004.
- [119] Schmidt, A. M.; Yan, S. D.; Yan, S. F.; Stern, D. M. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* **108** (2001) 949-55.
- [120] Hofmann, M. A.; Drury, S.; Fu, C.; Qu, W.; Taguchi, A.; Lu, Y.; Avila, C.; Kambham, N.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; Neurath, M. F.; Slattery, T.; Beach, D.; McClary, J.; Nagashima, M.; Morser, J.; Stern, D.; Schmidt, A. M. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97** (1999) 889-901.
- [121] Arumugam, T.; Simeone, D. M.; Schmidt, A. M.; Logsdon, C. D. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* **279** (2004) 5059-65.

- [122] Ghavami, S.; Rashedi, I.; Dattilo, B. M.; Eshraghi, M.; Chazin, W. J.; Hashemi, M.; Wesselborg, S.; Kerkhoff, C.; Los, M. S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *J Leukoc Biol* **83** (2008) 1484-92.
- [123] Leclerc, E.; Fritz, G.; Weibel, M.; Heizmann, C. W.; Galichet, A. S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. *J Biol Chem* **282** (2007) 31317-31.
- [124] Huttunen, H. J.; Kuja-Panula, J.; Sorci, G.; Agneletti, A. L.; Donato, R.; Rauvala, H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* **275** (2000) 40096-105.
- [125] Leclerc, E.; Fritz, G.; Vetter, S. W.; Heizmann, C. W. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochim Biophys Acta* **1793** (2009) 993-1007.
- [126] Hori, O.; Brett, J.; Slattery, T.; Cao, R.; Zhang, J. H.; Chen, J. X.; Nagashima, M.; Lundh, E. R.; Vijay, S.; Nitecki, D.; Morser, J.; Stern, D.; Schmidt, A. M. The Receptor for Advanced Glycation End-Products (Rage) Is a Cellular-Binding Site for Amphoterin - Mediation of Neurite Outgrowth and Coexpression of Rage and Amphoterin in the Developing Nervous-System. *J Biol Chem* **270** (1995) 25752-61.
- [127] Yan, S. D.; Chen, X.; Fu, J.; Chen, M.; Zhu, H.; Roher, A.; Slattery, T.; Zhao, L.; Nagashima, M.; Morser, J.; Migheli, A.; Nawroth, P.; Stern, D.; Schmidt, A. M. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **382** (1996) 685-91.
- [128] Chavakis, T.; Bierhaus, A.; Al-Fakhri, N.; Schneider, D.; Witte, S.; Linn, T.; Nagashima, M.; Morser, J.; Arnold, B.; Preissner, K. T.; Nawroth, P. P. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* **198** (2003) 1507-15.
- [129] Brett, J.; Schmidt, A. M.; Yan, S. D.; Zou, Y. S.; Weidman, E.; Pinsky, D.; Nowygrod, R.; Neeper, M.; Przysiecki, C.; Shaw, A.; et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* **143** (1993) 1699-712.
- [130] Demling, N.; Ehrhardt, C.; Kasper, M.; Laue, M.; Knels, L.; Rieber, E. P. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res* **323** (2006) 475-88.
- [131] Wendt, T. M.; Tanji, N.; Guo, J.; Kislinger, T. R.; Qu, W.; Lu, Y.; Bucciarelli, L. G.; Rong, L. L.; Moser, B.; Markowitz, G. S.; Stein, G.; Bierhaus, A.; Liliensiek, B.; Arnold, B.; Nawroth, P. P.; Stern, D. M.; D'Agati, V. D.; Schmidt, A. M. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* **162** (2003) 1123-37.
- [132] Tanji, N.; Markowitz, G. S.; Fu, C. F.; Kislinger, T.; Taguchi, A.; Pischetsrieder, M.; Stern, D.; Schmidt, A. M.; D'Agati, V. D. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* **11** (2000) 1656-66.

- [133] Harja, E.; Bu, D. X.; Hudson, B. I.; Chang, J. S.; Shen, X.; Hallam, K.; Kalea, A. Z.; Lu, Y.; Rosario, R. H.; Oruganti, S.; Nikolla, Z.; Belov, D.; Lalla, E.; Ramasamy, R.; Yan, S. F.; Schmidt, A. M. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest* **118** (2008) 183-94.
- [134] Ritthaler, U.; Deng, Y.; Zhang, Y.; Greten, J.; Abel, M.; Sido, B.; Allenberg, J.; Otto, G.; Roth, H.; Bierhaus, A.; et al. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. *Am J Pathol* **146** (1995) 688-94.
- [135] Sunahori, K.; Yamamura, M.; Yamana, J.; Takasugi, K.; Kawashima, M.; Makino, H. Increased expression of receptor for advanced glycation end products by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **54** (2006) 97-104.
- [136] Logsdon, C. D.; Fuentes, M. K.; Huang, E. H.; Arumugam, T. RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med* **7** (2007) 777-89.
- [137] Sasaki, N.; Toki, S.; Chowei, H.; Saito, T.; Nakano, N.; Hayashi, Y.; Takeuchi, M.; Makita, Z. Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Res* **888** (2001) 256-62.
- [138] Bartling, B.; Hofmann, H.-S.; Weigle, B.; Silber, R.-E.; Simm, A. Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* **26** (2005) 293-301.
- [139] Englert, J. M.; Hanford, L. E.; Kaminski, N.; Tobolewski, J. M.; Tan, R. J.; Fattman, C. L.; Ramsgaard, L.; Richards, T. J.; Loutaev, I.; Nawroth, P. P.; Kasper, M.; Bierhaus, A.; Oury, T. D. A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **172** (2008) 583-91.
- [140] Kislinger, T.; Fu, C.; Huber, B.; Qu, W.; Taguchi, A.; Du Yan, S.; Hofmann, M.; Yan, S. F.; Pischetsrieder, M.; Stern, D.; Schmidt, A. M. N ϵ -(Carboxymethyl)Lysine Adducts of Proteins Are Ligands for Receptor for Advanced Glycation End Products That Activate Cell Signaling Pathways and Modulate Gene Expression. *J Biol Chem* **274** (1999) 31740-49.
- [141] Dattilo, B. M.; Fritz, G.; Leclerc, E.; Kooi, C. W.; Heizmann, C. W.; Chazin, W. J. The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry* **46** (2007) 6957-70.
- [142] Koch, M.; Chitayat, S.; Dattilo, B. M.; Schiefner, A.; Diez, J.; Chazin, W. J.; Fritz, G. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure* **18** (2010) 1342-52.
- [143] Srikrishna, G.; Nayak, J.; Weigle, B.; Temme, A.; Foell, D.; Hazelwood, L.; Olsson, A.; Volkman, N.; Hanein, D.; Freeze, H. H. Carboxylated N-glycans on RAGE promote S100A12 binding and signaling. *J Cell Biochem* **110** (2010) 645-59.
- [144] Hudson, B. I.; Carter, A. M.; Harja, E.; Kalea, A. Z.; Arriero, M.; Yang, H.; Grant, P. J.; Schmidt, A. M. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J* **22** (2008) 1572-80.
- [145] Galichet, A.; Weibel, M.; Heizmann, C. W. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **370** (2008) 1-5.

- [146] Raucci, A.; Cugusi, S.; Antonelli, A.; Barabino, S. M.; Monti, L.; Bierhaus, A.; Reiss, K.; Saftig, P.; Bianchi, M. E. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J* **22** (2008) 3716-27.
- [147] Zhang, L.; Bukulin, M.; Kojro, E.; Roth, A.; Metz, V. V.; Fahrenholz, F.; Nawroth, P. P.; Bierhaus, A.; Postina, R. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem* **283** (2008) 35507-16.
- [148] Schmidt, A. M.; Hori, O.; Brett, J.; Yan, S. D.; Wautier, J. L.; Stern, D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* **14** (1994) 1521-8.
- [149] Wautier, J. L.; Zoukourian, C.; Chappey, O.; Wautier, M. P.; Guillausseau, P. J.; Cao, R.; Hori, O.; Stern, D.; Schmidt, A. M. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* **97** (1996) 238-43.
- [150] Taguchi, A.; Blood, D. C.; del Toro, G.; Canet, A.; Lee, D. C.; Qu, W.; Tanji, N.; Lu, Y.; Lalla, E.; Fu, C.; Hofmann, M. A.; Kislinger, T.; Ingram, M.; Lu, A.; Tanaka, H.; Hori, O.; Ogawa, S.; Stern, D. M.; Schmidt, A. M. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* **405** (2000) 354-60.
- [151] Yonekura, H.; Yamamoto, Y.; Sakurai, S.; Petrova, R. G.; Abedin, M. J.; Li, H.; Yasui, K.; Takeuchi, M.; Makita, Z.; Takasawa, S.; Okamoto, H.; Watanabe, T.; Yamamoto, H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* **370** (2003) 1097-109.
- [152] Hoppmann, S. Dissertation, ¹⁸F-markierte S100-Proteine als potentielle Radioliganden für die funktionelle Charakterisierung des Rezeptors für *advanced glycation endproducts* (RAGE) *in vitro* und *in vivo*", (2009) TU Dresden.
- [153] Lander, H. M.; Tauras, J. M.; Ogiste, J. S.; Hori, O.; Moss, R. A.; Schmidt, A. M. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* **272** (1997) 17810-4.
- [154] Huttunen, H. J.; Fages, C.; Rauvala, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* **274** (1999) 19919-24.
- [155] Yeh, C. H.; Sturgis, L.; Haidacher, J.; Zhang, X. N.; Sherwood, S. J.; Bjerkke, R. J.; Juhasz, O.; Crow, M. T.; Tilton, R. G.; Denner, L. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* **50** (2001) 1495-504.
- [156] Huang, J. S.; Guh, J. Y.; Chen, H. C.; Hung, W. C.; Lai, Y. H.; Chuang, L. Y. Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *J Cell Biochem* **81** (2001) 102-13.
- [157] Huttunen, H. J.; Kuja-Panula, J.; Rauvala, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling induces CREB-dependent chromogranin expression during neuronal differentiation. *J Biol Chem* **277** (2002) 38635-46.

- [158] Zeng, S.; Dun, H.; Ippagunta, N.; Rosario, R.; Zhang, Q. Y.; Lefkowitz, J.; Yan, S. F.; Schmidt, A. M.; Emond, J. C. Receptor for advanced glycation end product (RAGE)-dependent modulation of early growth response-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol* **50** (2009) 929-36.
- [159] Hudson, B. I.; Kalea, A. Z.; Del Mar Arriero, M.; Harja, E.; Boulanger, E.; D'Agati, V.; Schmidt, A. M. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* **283** (2008) 34457-68.
- [160] Xie, J.; Reverdatto, S.; Frolov, A.; Hoffmann, R.; Burz, D. S.; Shekhtman, A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* **283** (2008) 27255-69.
- [161] Zong, H.; Madden, A.; Ward, M.; Mooney, M. H.; Elliott, C. T.; Stitt, A. W. Homodimerization is essential for the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signal transduction. *J Biol Chem* **285** (2010) 23137-46.
- [162] Lawrie, A.; Spiekerkoetter, E.; Martinez, E. C.; Ambartsumian, N.; Sheward, W. J.; MacLean, M. R.; Harmar, A. J.; Schmidt, A. M.; Lukanidin, E.; Rabinovitch, M. Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease. *Circ Res* **97** (2005) 227-35.
- [163] Spiekerkoetter, E.; Guignabert, C.; de Jesus Perez, V.; Alastalo, T. P.; Powers, J. M.; Wang, L.; Lawrie, A.; Ambartsumian, N.; Schmidt, A. M.; Berryman, M.; Ashley, R. H.; Rabinovitch, M. S100A4 and bone morphogenetic protein-2 codependently induce vascular smooth muscle cell migration via phospho-extracellular signal-regulated kinase and chloride intracellular channel 4. *Circ Res* **105** (2009) 639-47, 13 p following 647.
- [164] Hsieh, H. L.; Schafer, B. W.; Sasaki, N.; Heizmann, C. W. Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays. *Biochem Biophys Res Commun* **307** (2003) 375-81.
- [165] Fritsch, P. "Dermatologie und Venerologie für das Studium", Springer, Berlin (2009).
- [166] Gohl, J.; Hohenberger, W.; Merkel, S. Malignes Melanom. *Chirurg* **80** (2009) 559-67.
- [167] Ferlay, J.; Shin, H. R.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C.; Parkin, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127** (2010) 2893-917.
- [168] Kraywinkel, K.; Wolf, U.; Katalinic, A. "Hautkrebs - Epidemiologie und Früherkennung" in: Themenheft UV-Strahlung aus der Reihe UMID: Umwelt und Mensch - Informationsdienst des Umweltbundesamtes (Ausgabe 2/2012).
- [169] "Krebs in Deutschland 2007/2008", 8. Ausgabe, Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin (2012).
- [170] Kefford, R. "Melanoma" in: Encyclopedia of Cancer (Ed., Schwab, M.), Springer, Berlin (2009) 1804-1807.
- [171] Löpker, B.; Anders, M.; Breitbart, E.; Volkmer, B.; Greinert, R. "Hautkrebserkrankungen - ein noch weit unterschätztes Gesundheitsrisiko". in: Themenheft UV-Strahlung aus der Reihe "UMID: Umwelt und Mensch - Informationsdienst des Umweltbundesamtes (Ausgabe 2/2012).

- [172] Gray-Schopfer, V.; Wellbrock, C.; Marais, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445** (2007) 851-7.
- [173] Pleasance, E. D.; Cheetham, R. K.; Stephens, P. J.; McBride, D. J.; Humphray, S. J.; Greenman, C. D.; Varela, I.; Lin, M. L.; Ordonez, G. R.; Bignell, G. R.; Ye, K.; Alipaz, J.; Bauer, M. J.; Beare, D.; Butler, A.; Carter, R. J.; Chen, L.; Cox, A. J.; Edkins, S.; Kokko-Gonzales, P. I.; Gormley, N. A.; Grocock, R. J.; Haudenschild, C. D.; Hims, M. M.; James, T.; Jia, M.; Kingsbury, Z.; Leroy, C.; Marshall, J.; Menzies, A.; Mudie, L. J.; Ning, Z.; Royce, T.; Schulz-Trieglaff, O. B.; Spiridou, A.; Stebbings, L. A.; Szajkowski, L.; Teague, J.; Williamson, D.; Chin, L.; Ross, M. T.; Campbell, P. J.; Bentley, D. R.; Futreal, P. A.; Stratton, M. R. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* **463** (2010) 191-6.
- [174] Garbe, C.; Schadendorf, D.; Stolz, W.; Volkenandt, M.; Reinhold, U.; Kortmann, R.-D.; Kettelhack, C.; Frerich, B.; Keilholz, U.; Dummer, R.; Sebastian, G.; Tilgen, W.; Schuler, G.; Mackensen, A.; Kaufmann, R.; Hauschild, A. Kurzleitlinie - Malignes Melanom der Haut. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **6** (2008).
- [175] Leclerc, E.; Heizmann, C. W.; Vetter, S. W. RAGE and S100 protein transcription levels are highly variable in human melanoma tumors and cells. *Gen Physiol Biophys* **28** (2009) F65-75.
- [176] Boni, R.; Burg, G.; Doguoglu, A.; Ilg, E. C.; Schafer, B. W.; Muller, B.; Heizmann, C. W. Immunohistochemical localization of the Ca²⁺ binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions. *Br J Dermatol* **137** (1997) 39-43.
- [177] Petersson, S.; Shubbar, E.; Enerback, L.; Enerback, C. Expression patterns of S100 proteins in melanocytes and melanocytic lesions. *Melanoma Res* **19** (2009) 215-25.
- [178] Abe, R.; Shimizu, T.; Sugawara, H.; Watanabe, H.; Nakamura, H.; Choei, H.; Sasaki, N.; Yamagishi, S.; Takeuchi, M.; Shimizu, H. Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions. *J Invest Dermatol* **122** (2004) 461-7.
- [179] Hoppmann, S.; Steinbach, J.; Pietzsch, J. Scavenger receptors are associated with cellular interactions of S100A12 in vitro and in vivo. *Int J Biochem Cell Biol* **42** (2010) 651-61.
- [180] Mullis, K. B.; Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155** (1987) 335-50.
- [181] Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96** (1990) 23-8.
- [182] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (1970) 680-5.
- [183] Mading, P.; Fuchtnner, F.; Wust, F. Module-assisted synthesis of the bifunctional labelling agent N-succinimidyl 4-[(18)F]fluorobenzoate ([18)F]SFB). *Appl Radiat Isot* **63** (2005) 329-32.
- [184] Hoppmann, S.; Haase, C.; Richter, S.; Pietzsch, J. Expression, purification and fluorine-18 radiolabeling of recombinant S100 proteins - potential probes for molecular imaging of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in vivo. *Protein Expr Purif* **57** (2008) 143-52.
- [185] Wolfe, R. R. "Radioactive and Stable Isotope Tracers in Biomedicine: Principles and Practice of Kinetic Analysis", New York: Wiley-Liss (1992).

- [186] Entschladen, F.; Drell, T. L. t.; Lang, K.; Masur, K.; Palm, D.; Bastian, P.; Niggemann, B.; Zaenker, K. S. Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res* **307** (2005) 418-26.
- [187] Wolf, S.; Haase-Kohn, C.; Lenk, J.; Hoppmann, S.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, J. Expression, purification and fluorine-18 radiolabeling of recombinant S100A4: a potential probe for molecular imaging of receptor for advanced glycation endproducts in vivo? *Amino Acids* **41** (2011) 809-20.
- [188] Clark, D. P.; Pazdernik, N. J. "Molekulare Biotechnologie", Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (2009).
- [189] Smith, D. B.; Johnson, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67** (1988) 31-40.
- [190] Berge, G.; Pettersen, S.; Grotterod, I.; Bettum, I. J.; Boye, K.; Maelandsmo, G. M. Osteopontin--an important downstream effector of S100A4-mediated invasion and metastasis. *Int J Cancer* **129** (2011) 780-90.
- [191] Flatmark, K.; Maelandsmo, G. M.; Mikalsen, S. O.; Nustad, K.; Varaas, T.; Rasmussen, H.; Meling, G. I.; Fodstad, O.; Paus, E. Immunofluorometric assay for the metastasis-related protein S100A4: release of S100A4 from normal blood cells prohibits the use of S100A4 as a tumor marker in plasma and serum. *Tumour Biol* **25** (2004) 31-40.
- [192] Ismail, T. M.; Fernig, D. G.; Rudland, P. S.; Terry, C. J.; Wang, G.; Barraclough, R. The basic C-terminal amino acids of calcium-binding protein S100A4 promote metastasis. *Carcinogenesis* **29** (2008) 2259-66.
- [193] Kim, E. J.; Helfman, D. M. Characterization of the metastasis-associated protein, S100A4. Roles of calcium binding and dimerization in cellular localization and interaction with myosin. *J Biol Chem* **278** (2003) 30063-73.
- [194] Tarabykina, S.; Kriajevska, M.; Scott, D. J.; Hill, T. J.; Lafitte, D.; Derrick, P. J.; Dodson, G. G.; Lukanidin, E.; Bronstein, I. Heterocomplex formation between metastasis-related protein S100A4 (Mts1) and S100A1 as revealed by the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett* **475** (2000) 187-91.
- [195] Zhang, H.; Wang, Z.; Ding, Y.; Wang, G.; Wang, X.; Bartlam, M.; Tang, H.; Liu, Y.; Jiang, F.; Barraclough, R.; Rudland, P. S.; Rao, Z. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a metastasis-inducing protein, human S100A4. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58** (2002) 127-9.
- [196] Hoppmann, S.; Haase, C.; Richter, S.; Strobel, K.; Steinbach, J.; Pietzsch, J. Fluorine-18 radiolabeling of S100/calgranulins: potential probes for molecular imaging of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in vivo. in: Recent Advances of Bioconjugation Chemistry in Molecular Imaging (Ed., Chen, X. e.) Research Signpost, Trivandrum (Kerala), India (2008) 329-351.
- [197] Hoppmann, S.; Haase, C.; Richter, S.; Pietzsch, J. Expression, purification and fluorine-18 radiolabeling of recombinant S100 proteins--potential probes for molecular imaging of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in vivo. *Protein Expr Purif* **57** (2008) 143-52.
- [198] House, R. P.; Pozzuto, M.; Patel, P.; Dulyaninova, N. G.; Li, Z. H.; Zencheck, W. D.; Vitolo, M. I.; Weber, D. J.; Bresnick, A. R. Two functional S100A4 monomers are necessary for regulating nonmuscle myosin-IIA and HCT116 cell invasion. *Biochemistry* **50** (2011) 6920-32.

- [199] Zhang, S.; Wang, G.; Fernig, D. G.; Rudland, P. S.; Webb, S. E.; Barraclough, R.; Martin-Fernandez, M. Interaction of metastasis-inducing S100A4 protein in vivo by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Eur Biophys J* **34** (2005) 19-27.
- [200] Zhang, S.; Wang, G.; Liu, D.; Bao, Z.; Fernig, D. G.; Rudland, P. S.; Barraclough, R. The C-terminal region of S100A4 is important for its metastasis-inducing properties. *Oncogene* **24** (2005) 4401-11.
- [201] Tarabykina, S.; Scott, D. J.; Herzyk, P.; Hill, T. J.; Tame, J. R.; Kriajevska, M.; Lafitte, D.; Derrick, P. J.; Dodson, G. G.; Maitland, N. J.; Lukanidin, E. M.; Bronstein, I. B. The dimerization interface of the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1): in vivo and in vitro studies. *J Biol Chem* **276** (2001) 24212-22.
- [202] Karlsson, R.; Falt, A. Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J Immunol Methods* **200** (1997) 121-33.
- [203] Matsumoto, S.; Yoshida, T.; Murata, H.; Harada, S.; Fujita, N.; Nakamura, S.; Yamamoto, Y.; Watanabe, T.; Yonekura, H.; Yamamoto, H.; Ohkubo, T.; Kobayashi, Y. Solution Structure of the Variable-Type Domain of the Receptor for Advanced Glycation End Products: New Insight into AGE–RAGE Interaction. *Biochemistry* **47** (2008) 12299-12311.
- [204] Xie, J.; Burz, D. S.; He, W.; Bronstein, I. B.; Lednev, I.; Shekhtman, A. Hexameric calgranulin C (S100A12) binds to the receptor for advanced glycosylated end products (RAGE) using symmetric hydrophobic target-binding patches. *J Biol Chem* **282** (2007) 4218-31.
- [205] Fritz, G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci* **36** (2011) 625-32.
- [206] Park, H.; Adsit, F. G.; Boyington, J. C. The 1.5 Å crystal structure of human receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) ectodomains reveals unique features determining ligand binding. *J Biol Chem* **285** (2010) 40762-70.
- [207] Sorci, G.; Riuzzi, F.; Giambanco, I.; Donato, R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta* **1833** (2013) 101-9.
- [208] Kierdorf, K.; Fritz, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol* (2013).
- [209] Horiuchi, S.; Sakamoto, Y.; Sakai, M. Scavenger receptors for oxidized and glycosylated proteins. *Amino Acids* **25** (2003) 283-92.
- [210] Sevillano, N.; Giron, M. D.; Salido, M.; Vargas, A. M.; Vilches, J.; Salto, R. Internalization of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) is required to mediate intracellular responses. *J Biochem* **145** (2009) 21-30.
- [211] Perrone, L.; Peluso, G.; Melone, M. A. RAGE recycles at the plasma membrane in S100B secretory vesicles and promotes Schwann cells morphological changes. *J Cell Physiol* **217** (2008) 60-71.
- [212] Sbail, O.; Devi, T. S.; Melone, M. A.; Feron, F.; Khrestchatisky, M.; Singh, L. P.; Perrone, L. RAGE-TXNIP axis is required for S100B-promoted Schwann cell migration, fibronectin expression and cytokine secretion. *J Cell Sci* **123** (2010) 4332-9.

- [213] Kurtz, A. "Funktion der Nieren und Regulation des Wasser- und Elektrolyt-Haushalts". in: Biochemie & Pathobiochemie (Eds., Löffler, G.; Petrides, P. E.; Heinrich, P. C.) Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2007).
- [214] Jonsson, H.; Johnsson, P.; Hoglund, P.; Alling, C.; Blomquist, S. Elimination of S100B and renal function after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **14** (2000) 698-701.
- [215] Usui, A.; Kato, K.; Abe, T.; Murase, M.; Tanaka, M.; Takeuchi, E. S-100ao protein in blood and urine during open-heart surgery. *Clin Chem* **35** (1989) 1942-4.
- [216] Fehrenbach, H.; Kasper, M.; Tschernig, T.; Shearman, M. S.; Schuh, D.; Muller, M. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **44** (1998) 1147-57.
- [217] Shirasawa, M.; Fujiwara, N.; Hirabayashi, S.; Ohno, H.; Iida, J.; Makita, K.; Hata, Y. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes Cells* **9** (2004) 165-174.
- [218] Miyazaki, A.; Nakayama, H.; Horiuchi, S. Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *Trends Cardiovasc Med* **12** (2002) 258-62.
- [219] Ito, S.; Naito, M.; Kobayashi, Y.; Takatsuka, H.; Jiang, S.; Usuda, H.; Umezu, H.; Hasegawa, G.; Arakawa, M.; Shultz, L. D.; Elomaa, O.; Tryggvason, K. Roles of a macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) in host defense and heterogeneity of splenic marginal zone macrophages. *Arch Histol Cytol* **62** (1999) 83-95.
- [220] Terpstra, V.; van Amersfoort, E. S.; van Velzen, A. G.; Kuiper, J.; van Berkel, T. J. Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20** (2000) 1860-72.
- [221] Ikoma, N.; Yamazaki, H.; Abe, Y.; Oida, Y.; Ohnishi, Y.; Suemizu, H.; Matsumoto, H.; Matsuyama, T.; Ohta, Y.; Ozawa, A.; Ueyama, Y.; Nakamura, M. S100A4 expression with reduced E-cadherin expression predicts distant metastasis of human malignant melanoma cell lines in the NOD/SCID/gammaCnull (NOG) mouse model. *Oncol Rep* **14** (2005) 633-7.
- [222] Fidler, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* **35** (1975) 218-24.
- [223] Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51** (1973) 1417-23.
- [224] Widmer, D. S.; Cheng, P. F.; Eichhoff, O. M.; Belloni, B. C.; Zipser, M. C.; Schlegel, N. C.; Javelaud, D.; Mauviel, A.; Dummer, R.; Hoek, K. S. Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res* **25** (2012) 343-53.
- [225] Jenkinson, S. R.; Barraclough, R.; West, C. R.; Rudland, P. S. S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis. *Br J Cancer* **90** (2004) 253-62.

- [226] Radestock, Y.; Willing, C.; Kehlen, A.; Hoang-Vu, C.; Hombach-Klonisch, S. Relaxin enhances S100A4 and promotes growth of human thyroid carcinoma cell xenografts. *Mol Cancer Res* **8** (2010) 494-506.
- [227] Cui, J. F.; Liu, Y. K.; Zhang, L. J.; Shen, H. L.; Song, H. Y.; Dai, Z.; Yu, Y. L.; Zhang, Y.; Sun, R. X.; Chen, J.; Tang, Z. Y.; Yang, P. Y. Identification of metastasis candidate proteins among HCC cell lines by comparative proteome and biological function analysis of S100A4 in metastasis in vitro. *Proteomics* **6** (2006) 5953-61.
- [228] Shi, Y.; Zou, M.; Collison, K.; Baitei, E. Y.; Al-Makhalafi, Z.; Farid, N. R.; Al-Mohanna, F. A. Ribonucleic acid interference targeting S100A4 (Mts1) suppresses tumor growth and metastasis of anaplastic thyroid carcinoma in a mouse model. *J Clin Endocrinol Metab* **91** (2006) 2373-9.
- [229] Gao, X. N.; Tang, S. Q.; Zhang, X. F. S100A4 antisense oligodeoxynucleotide suppresses invasive potential of neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg* **40** (2005) 648-52.
- [230] Xie, R.; Schlumbrecht, M. P.; Shipley, G. L.; Xie, S. S.; Bassett, R. L.; Broaddus, R. R. S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF-beta 1 signaling. *Lab Invest* **89** (2009) 937-47.
- [231] Huang, L.; Xu, Y.; Cai, G.; Guan, Z.; Cai, S. Downregulation of S100A4 expression by RNA interference suppresses cell growth and invasion in human colorectal cancer cells. *Oncol Rep* **27** (2012) 917-22.
- [232] Wang, L.; Wang, X.; Liang, Y.; Diao, X.; Chen, Q. S100A4 promotes invasion and angiogenesis in breast cancer MDA-MB-231 cells by upregulating matrix metalloproteinase-13. *Acta Biochim Pol* **59** (2012) 593-8.
- [233] Goh Then Sin, C.; Hersch, N.; Rudland, P. S.; Barraclough, R.; Hoffmann, B.; Gross, S. R. S100A4 downregulates filopodia formation through increased dynamic instability. *Cell Adh Migr* **5** (2011) 439-47.
- [234] Tabata, T.; Tsukamoto, N.; Fooladi, A. A.; Yamanaka, S.; Furukawa, T.; Ishida, M.; Sato, D.; Gu, Z.; Nagase, H.; Egawa, S.; Sunamura, M.; Horii, A. RNA interference targeting against S100A4 suppresses cell growth and motility and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **390** (2009) 475-80.
- [235] Grum-Schwensen, B.; Klingelhofer, J.; Berg, C. H.; El-Naaman, C.; Grigorian, M.; Lukanidin, E.; Ambartsumian, N. Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res* **65** (2005) 3772-80.
- [236] Fujiwara, M.; Kashima, T. G.; Kunita, A.; Kii, I.; Komura, D.; Grigoriadis, A. E.; Kudo, A.; Aburatani, H.; Fukayama, M. Stable knockdown of S100A4 suppresses cell migration and metastasis of osteosarcoma. *Tumour Biol* **32** (2011) 611-22.
- [237] Kim, T. H.; Kim, H. I.; Soung, Y. H.; Shaw, L. A.; Chung, J. Integrin (alpha6beta4) signals through Src to increase expression of S100A4, a metastasis-promoting factor: implications for cancer cell invasion. *Mol Cancer Res* **7** (2009) 1605-12.
- [238] Stein, U.; Arlt, F.; Walther, W.; Smith, J.; Waldman, T.; Harris, E. D.; Mertins, S. D.; Heizmann, C. W.; Allard, D.; Birchmeier, W.; Schlag, P. M.; Shoemaker, R. H. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology* **131** (2006) 1486-500.

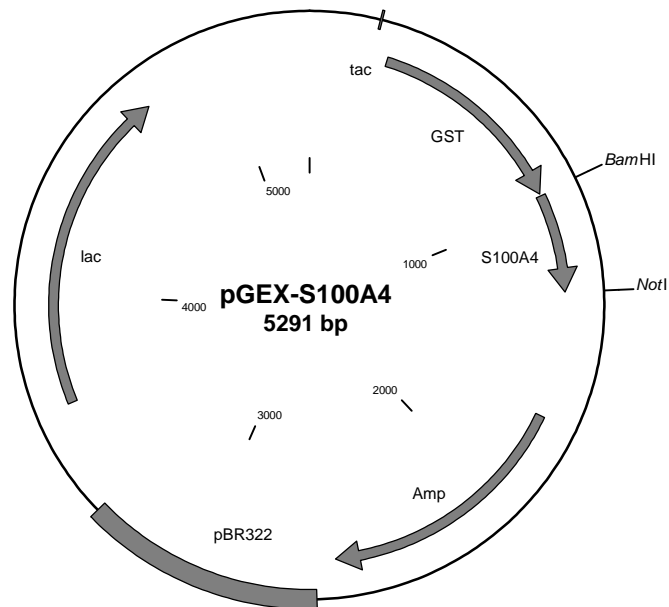
- [239] Chen, M.; Sinha, M.; Luxon, B. A.; Bresnick, A. R.; O'Connor, K. L. Integrin alpha6beta4 controls the expression of genes associated with cell motility, invasion, and metastasis, including S100A4/metastasin. *J Biol Chem* **284** (2009) 1484-94.
- [240] Wagener, C.; Müller, O. "Molekulare Onkologie", Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart (2010).
- [241] Haase-Kohn, C.; Wolf, S.; Lenk, J.; Pietzsch, J. Copper-mediated cross-linking of S100A4, but not of S100A2, results in proinflammatory effects in melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **413** (2011) 494-8.
- [242] Frid, M. G.; Li, M.; Gnanasekharan, M.; Burke, D. L.; Fragoso, M.; Strassheim, D.; Sylman, J. L.; Stenmark, K. R. Sustained hypoxia leads to the emergence of cells with enhanced growth, migratory, and promitogenic potentials within the distal pulmonary artery wall. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297** (2009) L1059-72.
- [243] Bierhaus, A.; Schiekofer, S.; Schwaninger, M.; Andrassy, M.; Humpert, P. M.; Chen, J.; Hong, M.; Luther, T.; Henle, T.; Kloting, I.; Morcos, M.; Hofmann, M.; Tritschler, H.; Weigle, B.; Kasper, M.; Smith, M.; Perry, G.; Schmidt, A. M.; Stern, D. M.; Haring, H. U.; Schleicher, E.; Nawroth, P. P. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* **50** (2001) 2792-808.
- [244] Yan, S. D.; Zhu, H.; Zhu, A.; Golabek, A.; Du, H.; Roher, A.; Yu, J.; Soto, C.; Schmidt, A. M.; Stern, D.; Kindy, M. Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nat Med* **6** (2000) 643-51.
- [245] Yan, S. D.; Schmidt, A. M.; Anderson, G. M.; Zhang, J. H.; Brett, J.; Zou, Y. S.; Pinsky, D.; Stern, D. Enhanced Cellular Oxidant Stress by the Interaction of Advanced Glycation End-Products with Their Receptors Binding-Proteins. *J Biol Chem* **269** (1994) 9889-97.
- [246] Chuong, C.; Katz, J.; Pauley, K. M.; Bulosan, M.; Cha, S. RAGE expression and NF-kappaB activation attenuated by extracellular domain of RAGE in human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* **221** (2009) 430-4.
- [247] Tanaka, N.; Yonekura, H.; Yamagishi, S.; Fujimori, H.; Yamamoto, Y.; Yamamoto, H. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **275** (2000) 25781-90.
- [248] Karin, M. Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression. *Nature* **441** (2006) 431-36.
- [249] Amiri, K. I.; Richmond, A. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **24** (2005) 301-13.
- [250] Kuniyasu, H.; Oue, N.; Wakikawa, A.; Shigeishi, H.; Matsutani, N.; Kuraoka, K.; Ito, R.; Yokozaki, H.; Yasui, W. Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J Pathol* **196** (2002) 163-70.
- [251] Dukhanina, E. A.; Lukyanova, T. I.; Romanova, E. A.; Dukhanin, A. S.; Sashchenko, L. P. Comparative analysis of secretion of S100A4 metastatic marker by immune and tumor cells. *Bull Exp Biol Med* **145** (2008) 78-80.

- [252] Kozlowski, J. M.; Hart, I. R.; Fidler, I. J.; Hanna, N. A human melanoma line heterogeneous with respect to metastatic capacity in athymic nude mice. *J Natl Cancer Inst* **72** (1984) 913-7.
- [253] Grum-Schwensen, B.; Klingelhofer, J.; Grigorian, M.; Almholt, K.; Nielsen, B. S.; Lukanidin, E.; Ambartsumian, N. Lung metastasis fails in MMTV-PyMT oncomice lacking S100A4 due to a T-cell deficiency in primary tumors. *Cancer Res* **70** (2010) 936-47.
- [254] O'Connell, J. T.; Sugimoto, H.; Cooke, V. G.; MacDonald, B. A.; Mehta, A. I.; LeBleu, V. S.; Dewar, R.; Rocha, R. M.; Brentani, R. R.; Resnick, M. B.; Neilson, E. G.; Zeisberg, M.; Kalluri, R. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (2011) 16002-7.
- [255] Klingelhofer, J.; Grum-Schwensen, B.; Beck, M. K.; Knudsen, R. S.; Grigorian, M.; Lukanidin, E.; Ambartsumian, N. Anti-S100A4 Antibody Suppresses Metastasis Formation by Blocking Stroma Cell Invasion. *Neoplasia* **14** (2012) 1260-8.
- [256] Renard, C.; Chappay, O.; Wautier, M. P.; Nagashima, M.; Morser, J.; Scherrmann, J. M.; Wautier, J. L. The human and rat recombinant receptors for advanced glycation end products have a high degree of homology but different pharmacokinetic properties in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **290** (1999) 1458-66.

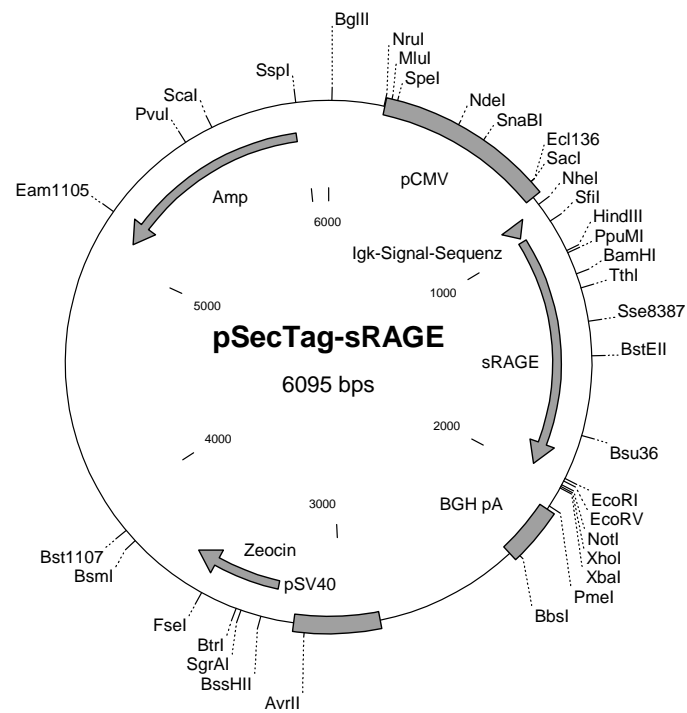
7 ANHANG

7.1 Vektorkarten

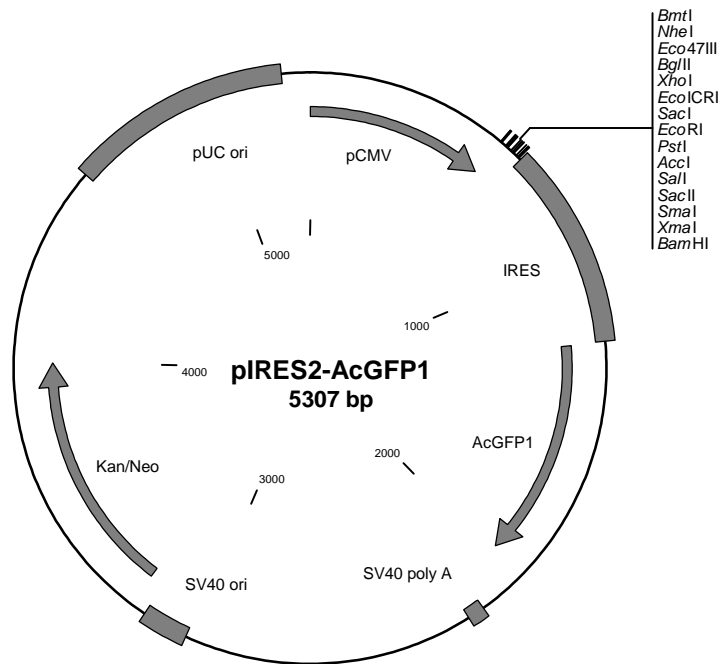
pGEX-6P-1-S100A4



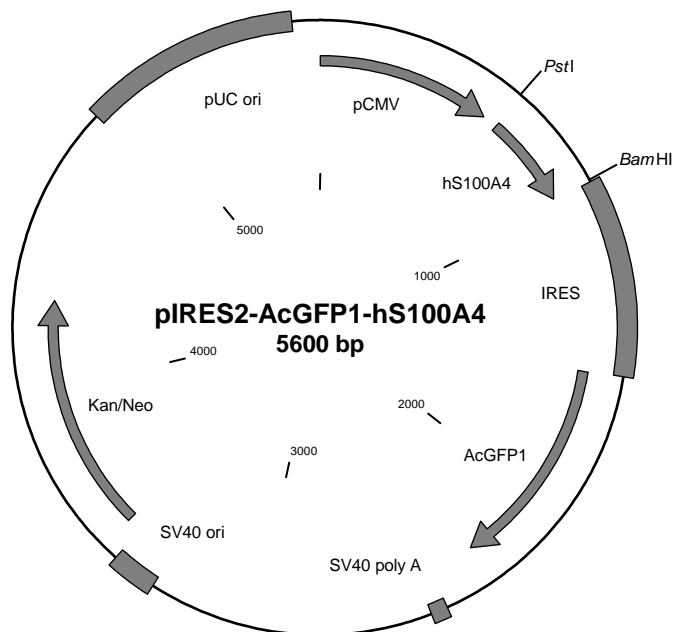
pSecTag2B-sRAGE (aus [152])



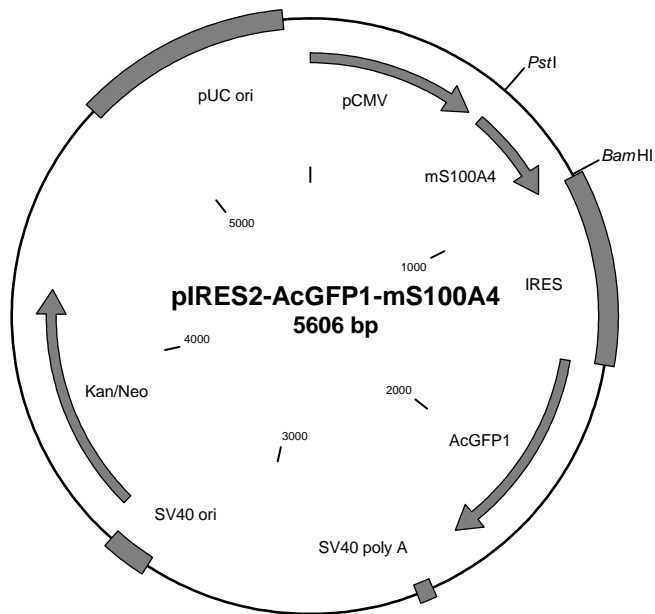
pIRES2-AcGFP1



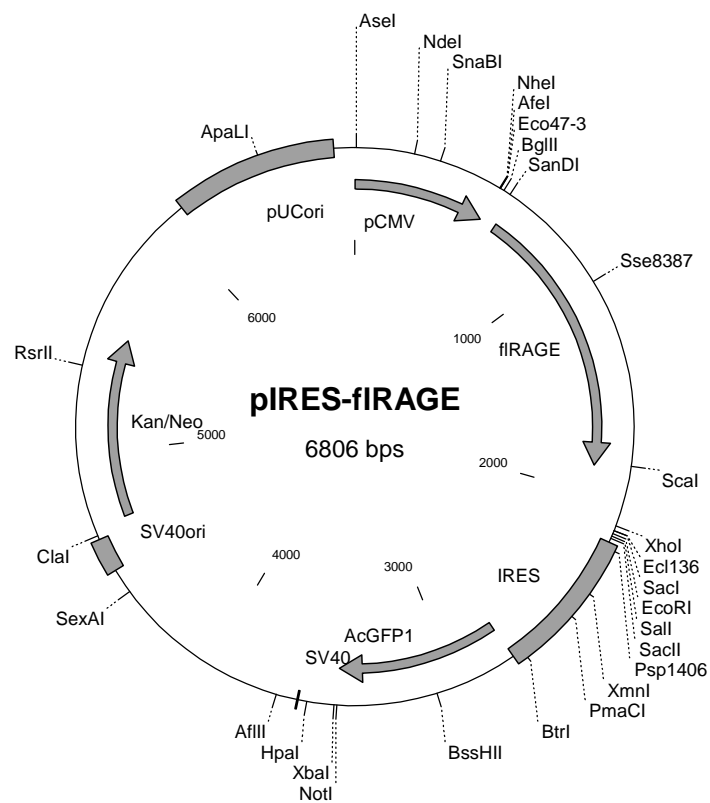
pIRES2-AcGFP1-hS100A4



pIRES2-AcGFP1-mS100A4



pIRES2-AcGFP1-hRAGE (aus [152])



7.2 Aminosäuresequenzen von *full length* RAGE und sRAGE

Humaner full length-RAGE:

1	MAAGTAVGAW	VLVLSLWGAV	VGAQNITARI	GEPLVLKCKG	APKKPPQRLE	WKLNTGRTEA
61	WKVLSPQGGG	PWDSVARVLP	NGSLFLPAVG	IQDEGIFRCQ	AMNRNGKETK	SNYRVRVYQI
121	PGKPEIVDSA	SELTAGVPNK	VGTCVSEGSY	PAGTLSWHLD	GKPLVPNEKG	SVKEQTRRHP
181	ETGLFTLQSE	LMVTPARGGD	PRPTFSCSFS	PGLPRHRALR	TAPIQPRVWE	PVPLEEVQLV
241	VEPEGGA VAP	GGTVTLTCEV	PAQPSPQIHW	MKDGVPPLPL	PSPVLILPEI	GPQDQGTYS C
301	VATHSSHGPQ	ESRAVSISII	EPGEEGPTAG	SVGGSGLGTL	ALALGILGGL	LGTAALLIGVI
361	LWQRRQR RGE	ERKAPENQEE	EEEEAEELNQ	SEEPEAGESS	TGGP	

1-22: *Leader-Sequenz/Signalpeptid*

31-106: *V-Domäne*

137-214: *C1-Domäne*

252-308: *C2-Domäne*

345-363: *Transmembrandomäne*

364-404: *Intrazelluläre Domäne*

Theoretisches Molekulargewicht: 42.802,6 Da

Modifiziert nach Renard et al. [256]

Rekombinanter, humaner sRAGE:

1		DRALP	AGAQNITARI	GEPLVLKCKG	APKKPPQRLE	WKLNTGRTEA
61	WKVLSPQGGG	PWDSVARVLP	NGSLFLPAVG	IQDEGIFRCQ	AMNRNGKETK	SNYRVRVYQI
121	PGKPEIVDSA	SELTAGVPNK	VGTCVSEGSY	PAGTLSWHLD	GKPLVPNEKG	VS VKEQTRRH
181	PETGLFTLQS	ELMVT PARGG	DPRPTFSCSF	SPGLPRHRAL	RTAPIQPRVW	EPVPLEEVQL
241	VVEPEGGA VA	PGGT VTLTCE	VPAQPSPQIH	WMKDGVP LPL	PPSPVLILPE	IGPQDQGTYS
301	CVATHSSHGP	QESRAVSISI	IEPGEEGPTA	GSVGGSGLGT	LALHHHHHH	

Theoretisches Molekulargewicht: 35.600 Da

8 VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONFERENZBEITRÄGE

Publikationen

Promotion:

Haase-Kohn, C.; **Wolf, S.**; Lenk, J.; Pietzsch, J. Copper-mediated cross-linking of S100A4, but not of S100A2, results in proinflammatory effects in melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **413** (2011) 494-8.

Wolf, S.; Haase-Kohn, C.; Lenk, J.; Hoppmann, S.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, J. Expression, purification and fluorine-18 radiolabeling of recombinant S100A4: a potential probe for molecular imaging of receptor for advanced glycation endproducts in vivo? *Amino Acids* **41** (2011) 809-20.

Wolf, S.; Haase-Kohn, C.; Pietzsch, J. S100A2 in cancerogenesis: a friend or a foe? *Amino Acids* **41** (2011) 849-61.

Diplomarbeit:

Stoevesandt, O.; Kohler, K.; **Wolf, S.**; Andre, T.; Hummel, W.; Brock, R. A network analysis of changes in molecular interactions in cellular signaling. *Mol Cell Proteomics* **6** (2007) 503-13.

Poster

Wolf, S. C.; Haase-Kohn, C.; Lenk, J.; Pietzsch, J. Autocrine regulation of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) by S100A4 promotes migration and invasion in A375 melanoma cells. 21st Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR-21), 26.-29.06.2010, Oslo, Norway, *EJC Supplements* **8** (2010) 118-119.

Haase-Kohn, C.; **Wolf, S.**; Pietzsch, J. Influence of irradiation on para- and autocrine regulation of extracellular S100A4 (metastasin) and its receptor RAGE in B16 mouse melanoma cells. 21st Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR-21), 26.-29.06.2010, Oslo, Norway, *EJC Supplements* **8** (2010) 211-212.

Haase, C.; **Wolf, S.**; Pietzsch, J. Irradiation of melanoma cells induced changes in the S100A4-RAGE interaction toward a promigratory phenotype. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (EANM), 11.-15.10.2008, München, Deutschland, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **35** (2008), S316

Haase, C.; **Wolf, S.**; Pietzsch, J. Irradiation-induced promigratory phenotype of melanoma cells: role of S100A4-RAGE interaction. 20th Meeting of the European Association for Cancer Research, 05.-08.07.2008, Lyon, France. *EJC Supplements* **6** (2008) 9, 21

9 DANKSAGUNG

Diese Seite möchte ich den Menschen widmen, die mich während meiner Promotionszeit begleitet und sowohl fachlich als auch moralisch unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Jörg Steinbach und Herrn Prof. Dr. Jens Pietzsch danke ich für die Möglichkeit dieses spannende und herausfordernde Promotionsthema im exzellenten wissenschaftlichen Umfeld des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf bearbeiten zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Jens Pietzsch für seine engagierte Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft, für viele wertvolle Hinweise und Ideen sowie für seine motivierende Art und Begeisterungsfähigkeit für erzielte Ergebnisse, die maßgeblich zu meiner Promotion beigetragen haben. Ich möchte mich weiterhin für die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Austausch durch die Teilnahme an Kongressen sowie für die fortwährende Unterstützung und Geduld bei der Finalisierung der Dissertationsschrift bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Karl-Heinz van Pee für das Interesse an der vorliegenden Arbeit und für die Möglichkeit zur Diskussion im Rahmen des Freitagseminars seiner Arbeitsgruppe sowie für die Übernahme des zweiten Gutachtens bedanken.

Frau Dr. Cathleen Haase-Kohn danke ich für die Einführung in den alltäglichen Laborbetrieb, für die freundliche Betreuung und das engagierte Lesen von Manuskripten und der vorliegenden Arbeit. Für das jederzeit offene Ohr, die praktischen Hinweise und das kritische Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Birgit Mosch bedanken.

Frau Dr. Susan Hoppmann danke ich für die Einführung in die Proteinreinigung, die ^{18}F -Radiomarkierung und den sRAGE-Bindungsassay. Bei Frau Dr. Franziska Graf möchte ich mich für so einige wertvolle Hinweise sowie für das fleißige Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit aus der Ferne bedanken.

Frau Dr. Bettina Reißerweber danke ich für das kritische Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit und natürlich für das nette Nebeneinander im Büro.

Ganz besonders möchte ich mich bei Aline Morgenegg, Mareike Barth, Catharina Heinig, Regina Herrlich, Uta Lenkeit, Sonja Lehnert und Alin Berndt für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken. Herrn Dr. Ralf Bergmann, Frau Dr. Birgit Mosch,

Mareike Barth und Regina Herrlich danke ich für die Durchführung der bzw. Unterstützung bei den tierexperimentellen Untersuchungen.

Jens Lenk danke ich für die Durchführung der SPR-Versuche und die anschließende Diskussion der Ergebnisse.

Für die nette Hilfe bei der visuellen Darstellung der Tumor-tragenden Mäuse möchte ich mich bei Sebastian Meister bedanken.

Großen Dank für die Lösung von Computerproblemen aller Art und zu fast jeder Zeit gebührt Thomas Brenner.

Nadine Herwig danke ich für die schnelle Literaturübermittlung, für die Verwendung ihre „*Scratch*“-Assay-Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sowie für die anregenden Diskussionen rund um die S100A4-RAGE-Thematik.

Bei Robert Wodtke möchte ich mich für die schnelle und unkomplizierte Erstellung der S100A4-Strukturen mit PyMOL bedanken.

Allen früheren und aktuellen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für Radiopharmazeutische (und Chemische) Biologie danke ich für die immer sehr freundliche Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft.

Meiner ganzen Familie danke ich für ihre stetige Unterstützung und für die „wochenendlichen“ Amanda-Betreuungen, die für die Fertigstellung dieser Arbeit unentbehrlich waren. Ein ganz besonderes Dankeschön gebührt meinem Schatzi André, für die Versorgung des seelischen und leiblichen Wohls während der Promotionszeit, für sein Verständnis und unheimlich große Geduld sowie für die zahlreichen Entbehrungen während der Finalisierung der Dissertation.

10 VERSICHERUNG UND ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Dissertation wurde im Institut für Radiopharmazie (seit 1.1.2013 Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung), Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Jörg Steinbach und Prof. Jens Pietzsch in der Zeit von Juni 2007 bis Februar 2011 angefertigt.

Bisherige erfolglose Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden.

Hiermit erkenne ich die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften an der Technischen Universität Dresden vom 23.02.2011 an.

Dresden, 17.09.2013

Susann Wolf